



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
CAMPUS DIADEMA



FÚLVIO GABRIEL CORAZZA

**AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE DA PAPAÍNA EM
FORMULAÇÕES ORAIS PARA TRATAMENTO DE
PATOLOGIAS INTESTINAIS UTILIZANDO TRIPLA CO-
CULTURA DE CÉLULAS CACO-2, HT29-MTX E RAJI COMO
MODELO *IN VITRO***

DIADEMA

2018

FÚLVIO GABRIEL CORAZZA

**AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE DA PAPAÍNA EM
FORMULAÇÕES ORAIS PARA TRATAMENTO DE
PATOLOGIAS INTESTINAIS UTILIZANDO TRIPLA CO-
CULTURA DE CÉLULAS CACO-2, HT29-MTX E RAJI COMO
MODELO *IN VITRO***

Dissertação apresentada, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências, ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* do Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas da Universidade Federal de São Paulo – *Campus* Diadema.

Orientadora: Patricia Santos Lopes

Co-Orientador: Newton Andréo Filho

DIADEMA

2018

Corazza, Fúlvio Gabriel

Avaliação da permeabilidade da papaína em formulações orais para tratamento de patologias intestinais utilizando tripla co-cultura de células Caco-2, HT29-MTX e Raji como modelo *in vitro* / Fúlvio Gabriel

Corazza. – – Diadema, 2018.

140 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de São Paulo - *Campus* Diadema, 2018.

Orientadora: Patricia Santos Lopes

Co-Orientador: Newton Andréo Filho

1. Permeação. 2. Papaína. 3. Furosemida. 4. Ciclodextrinas. 5. Liberação Controlada. I. Título

CDD 615.19

Folha de Aprovação



Serviço Público Federal
Universidade Federal de São Paulo
Pró – Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa

Em face dos referidos pareceres, a Comissão Julgadora considera a aluna **FÚLVIO GABRIEL CORAZZA** Aprovado (Aprovado/Reprovado) a receber o título de **MESTRE EM CIÊNCIAS** pela UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO. E, por estarem de acordo, assinam a presente ata.

São Paulo, 18 de junho de 2018.



Prof. Dr. Daniel Perez Vieira



Prof. Dr. Gustavo Henrique Costa Varca



Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud



Profa. Dra. Patrícia Santos Lopes

Agradecimentos

Aos meus pais e à minha família por sempre me incentivarem!

Ao Doug, pela paciência e pelo apoio incondicional!

A todos os meus amigos, pela amizade e pelos momentos felizes!

Aos amigos do Laboratório de Imunologia Celular e Bioquímica de Fungos e Protozoários, por todos os momentos passados juntos!

A todos os professores, pelo exemplo e aprendizado!

Aos técnicos do Núcleo de Apoio Técnico ao Ensino, Pesquisa e Extensão, pelo suporte!

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UNIFESP, por ter contribuído com a minha formação!

À FAPESP, pela concessão da bolsa e apoio financeiro para o desenvolvimento desse projeto!

À Pati, pela excelente orientação e, sobretudo, pela amizade!

Enfim, obrigado a todos que contribuíram com o meu desenvolvimento durante esse percurso!

“De tudo, ficaram três coisas: a certeza de que ele estava sempre começando, a certeza de que era preciso continuar e a certeza de que seria interrompido antes de terminar. Fazer da interrupção um caminho novo. Fazer da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sono uma ponte, da procura um encontro.”

Fernando Sabino

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia Celular e Bioquímica de Fungos e Protozoários da Universidade Federal de São Paulo – *Campus* Diadema e foi apoiado financeiramente pela FAPESP (processo nº. 2015/19213-0 - projeto regular e processo nº. 2015/19212-3 - bolsa de estudo).

Resumo

A papaína é uma fitoenzima utilizada na terapêutica para o tratamento de feridas devido a sua atividade proteolítica debridante capaz de estimular a cicatrização. Além disso, essa enzima também pode ser empregada como promotora de permeação de diversos compostos ativos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar *in vitro* a citotoxicidade, a fototoxicidade, a genotoxicidade e a capacidade das amostras contendo papaína livre e complexada com β -ciclodextrina e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina e minicomprimidos de papaína livre em promover a permeação da furosemida através da monocamada de células Caco-2 e da tripla co-cultura de células Caco-2, HT29-MTX e Raji. A IC_{50} (μM) da papaína livre sobre as células BALB/c 3T3, CHO-K1, Caco-2, HuTu 80, HT-29, HT29-MTX, Raji, Hep G2 e fibroblastos humanos foi de 3,8; 4,9; 1,4; 0,4; 4,5; 2,3; 2,6 e 1,6, respectivamente. A IC_{50} (μM) da papaína complexada β -ciclodextrina sobre as células BALB/c 3T3, CHO-K1, Caco-2, HuTu 80, HT-29, HT29-MTX, Hep G2 e fibroblastos humanos foi de 3,7; 3,5; 1,4; 2,8; 5,3; 1,9; 3,0; 1,8, respectivamente. A IC_{50} (μM) da papaína complexada 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina sobre as células BALB/c 3T3, CHO-K1, Caco-2, HuTu 80, HT-29, HT29-MTX, Hep G2 e fibroblastos humanos foi de 4,2; 2,5; 1,3; 3,3; 5,1; 1,8; 2,9; 1,5, respectivamente. As formulações de papaína não apresentaram citotoxicidade sobre as células de suspensão Raji e não foram capazes de promover a liberação de LDH. Na avaliação da fototoxicidade, as formulações contendo papaína foram consideradas não fototóxicas em concentrações inferiores a 0,67 μM . Na avaliação da genotoxicidade, as amostras também não apresentaram genotoxicidade sobre as células CHO-K1 e Hep G2 nas concentrações avaliadas. Empregando-se o modelo de monocamada de células Caco-2, a P_{app} da furosemida foi de $2,8 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$ e de $7,0 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$ na presença das formulações de papaína complexada com ciclodextrinas. O metoprolol apresentou P_{app} de $24 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$. O efluxo da rodamina 123 (ROD123) foi de 0,2 e a P_{app} do *Lucifer Yellow* (LY) foi de $4,3 \times 10^{-7} \text{ cm.s}^{-1}$, indicando a presença de P-gp e a manutenção da integridade paracelular da monocamada de células Caco-2. Empregando-se o modelo de monocamada de tripla co-cultura, a P_{app} da furosemida foi de $0,6 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$ e em média de $0,8 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$ na presença das formulações de papaína complexada com ciclodextrinas. O metoprolol apresentou P_{app} de $7,1 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$. O efluxo da ROD123 foi de 0,1 e a P_{app} do LY foi de $3,8 \times 10^{-7} \text{ cm.s}^{-1}$, indicando a presença de P-gp e a manutenção da integridade paracelular da monocamada de células. Os resultados apresentados sugerem que as formulações de papaína complexada com ciclodextrinas poderiam ser empregadas não somente como agentes terapêuticos no tratamento de patologias colônicas mas também como adjuvantes terapêuticos na promoção de permeação de fármacos que apresentam baixa permeabilidade oral.

Palavras-chave: permeação, papaína, furosemida, ciclodextrinas, liberação controlada.

Abstract

Papain is a phytoenzyme used in therapy for the treatment of wounds due to its proteolytic debridant activity capable of stimulating healing. Besides that, this enzyme can also be used as pharmaceutical actives permeation enhancer. The objective of the present study was to evaluate in vitro the cytotoxicity, phototoxicity, genotoxicity and capacity of samples containing free and complex papain with β -cyclodextrin and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and minitablets containing free papain in promoting the maintenance of furosemide through the Caco-2 cell monolayer and the triple co-culture of Caco-2, HT29-MTX and Raji cells. IC_{50} (μ M) of papain on BALB/c 3T3 cells, CHO-K1, Caco-2, HuTu 80, HT-29, HT29-MTX, Raji, Hep G2 and human fibroblasts was 3.8; 4.9; 1.4; 0.4; 4.5; 2.3; 2.6 and 1.6, respectively. The IC_{50} (μ M) of papain complexed with β -cyclodextrin on the same cell lines was 3.7; 3.5; 1.4; 2.8; 5.3; 1.9; 3.0; 1.8, respectively. The IC_{50} (μ M) of papain complexed with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin on the same cell lines was 4, 2; 2.5; 1.3; 3.3; 5.1; 1.8; 2.9; 1.5, respectively. Papain formulations did not show cytotoxicity on Raji cells and were unable to promote LDH release. In the phototoxicity evaluation, papain and its cyclodextrin complex were considered non-phototoxic at concentrations lower than 0.67 μ M. In the genotoxicity assessment, the samples also did not promote genotoxicity on CHO-K1 and Hep G2 cells at the concentrations evaluated. Using the Caco-2 cell monolayer model, the P_{app} of furosemide was $2.8 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$ and $7.0 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$ in the presence of the formulations of papain complexed with cyclodextrins. Meproprolol showed P_{app} of $24 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$. rhodamine 123 (ROD123) efflux ratio was 0.2 and the Lucifer Yellow (LY) P_{app} was $4.3 \times 10^{-7} \text{ cm.s}^{-1}$, indicating the presence of P-gp and paracellular integrity. Using the triple co-culture monolayer model, P_{app} of furosemide was $0.6 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$ and on average $0.8 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$ in the presence of formulations of papain complexed with cyclodextrins. Meproprolol presented P_{app} of $7.1 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$. The ROD123 efflux ratio was 0.1 and the LY P_{app} was $3.8 \times 10^{-7} \text{ cm.s}^{-1}$, indicating the presence of P-gp and maintaining the paracellular integrity of the cell monolayer. The results presented suggest that papain formulations complexed with cyclodextrins could be employed not only as therapeutic agents in the treatment of colonic pathologies but also as therapeutic adjuvants foccus in promoting permeation of drugs which have low oral permeability.

Key words: permeation, papain, furosemide, cyclodextrins, controlled release.

Lista de Figuras

Capítulo 1

Figura 1. Estratégias de <i>gating</i> para as análises. A. Quantificação das <i>beads</i> (círculo) utilizadas para análise quantitativa de núcleos; B. Exclusão de agregados nucleares (<i>doublers</i>); C. Discriminação de eventos com fluorescência igual ou maior a 1/100 do pico de menor fluorescência (núcleos em G0/G1); D e E. Discriminação por complexidade e tamanho dos eventos em relação à fluorescência, respectivamente; F. Remoção de eventos relacionado a células inviáveis (EMA ⁺); G. análise final, delimitando os eventos relacionados a núcleos e a micronúcleos.....	15
Figura 2. Curva analítica da atividade enzimática da papaína.....	16
Figura 3. Avaliação da citotoxicidade da papaína livre e complexada com β -ciclodextrina e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina sobre fibroblastos BALB/c 3T3 após 48 horas de incubação. A. papaína livre; B. papaína complexada com β -ciclodextrina; C. papaína complexada com 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina; D. β -ciclodextrina. E. 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina. Os dados representam a média de seis replicatas \pm desvio padrão de dois ensaios independentes (n = 12)	18
Figura 4. Avaliação da citotoxicidade da papaína livre e complexada com β -ciclodextrina e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina sobre células CHO-K1 após 48 horas de incubação. A. papaína livre; B. papaína complexada com β -ciclodextrina; C. papaína complexada com 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina; D. β -ciclodextrina. E. 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina. Os dados representam a média \pm desvio padrão de dois ensaios independentes (n = 12)	19
Figura 5. Avaliação da citotoxicidade da papaína livre e complexada com β -ciclodextrina e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina em Caco-2. A. papaína Livre; B. papaína complexada com β -ciclodextrina; C. papaína complexada com 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina; D. β -ciclodextrina. E. 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina. Os dados representam média \pm desvio padrão de dois ensaios independentes (n = 12).....	21
Figura 6. Avaliação da citotoxicidade da papaína livre e complexada com β -ciclodextrina e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina em HuTu 80. A. papaína Livre; B. papaína complexada com β -ciclodextrina; C. papaína complexada com 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina; D. β -ciclodextrina. E. 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina. Os dados representam média \pm desvio padrão de dois ensaios independentes (n = 12).....	22
Figura 7. Avaliação da citotoxicidade da papaína livre e complexada com β -ciclodextrina e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina em HT-29. A. papaína Livre; B. papaína complexada com β -ciclodextrina; C. papaína complexada com 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina; D. β -ciclodextrina. E. 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina. Os dados representam média \pm desvio padrão de dois ensaios independentes (n = 12).....	23

Figura 8. Avaliação da citotoxicidade da papaína livre e complexada com β -ciclodextrina e 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina em HT29-MTX. A. papaína Livre; B. papaína complexada com β -ciclodextrina; C. papaína complexada com 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina; D. β -ciclodextrina. E. 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina. Os dados representam média \pm desvio padrão de dois ensaios independentes (n = 12).....	24
Figura 9. Avaliação da citotoxicidade da papaína livre e complexada com β -ciclodextrina e 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina em Hep G2. A. papaína Livre; B. papaína complexada com β -ciclodextrina; C. papaína complexada com 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina; D. β -ciclodextrina. E. 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina. Os dados representam média \pm desvio padrão de dois ensaios independentes (n = 12).....	25
Figura 10. Avaliação da citotoxicidade da papaína livre e complexada com β -ciclodextrina e 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina em Raji. A. papaína Livre; B. papaína complexada com β -ciclodextrina; C. papaína complexada com 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina; D. β -ciclodextrina. E. 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina. Os dados representam média \pm desvio padrão de dois ensaios independentes (n = 12).....	26
Figura 11. Avaliação da citotoxicidade da papaína livre e complexada com β -ciclodextrina e 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina em fibroblastos humanos. A. papaína Livre; B. papaína complexada com β -ciclodextrina; C. papaína complexada com 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina; D. β -ciclodextrina. E. 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina. Os dados representam média \pm desvio padrão de dois ensaios independentes (n = 12)	27
Figura 12. Fototoxicidade da papaína livre e complexada com β -ciclodextrina e 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina. A. papaína livre; B. papaína complexada com β -ciclodextrina; C. papaína complexada com 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina; D. norfloxacino. Os dados representam média \pm desvio padrão de dois ensaios independentes (n = 12) * p < 0,05, ** p = 0,01 e ***p < 0,0001 comparado ao controle positivo seguido de análise <i>One-way</i> ANOVA e teste de Bonferroni	33
Figura 13. Quantidade relativa de micronúcleos (MN) formados após a linhagem CHO-K1 ser exposta às amostras de papaína livre (PPN), complexada com β -ciclodextrina (PPN- β -CD) e complexada com 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina (PPN-HP- β -CD) nas concentrações de 0,3, 0,7 e 1,3 μ M por 4 horas. Controle de Células (CC), Cloreto de sódio (NaCl), Colchicina (COLCH), Mitomicina C (MTMC), Dimetilsulfóxido (DMSO) foram utilizados como controles. Os dados representam a média de triplicatas \pm desvio padrão de dois ensaios independentes (n = 6) *p < 0,05; **p = 0,0003; ***p < 0,0001 comparado com controle de células seguido de análise <i>One-way</i> ANOVA e teste de Bonferroni	37
Figura 14. Quantidade relativa de micronúcleos (MN) formados após a linhagem Hep G2 ser exposta às amostras de papaína livre (PPN), complexada com β -ciclodextrina (PPN- β -CD) e complexada com 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina (PPN-HP- β -CD) nas concentrações de 0,3,	

0,7 e 1,3 μM por 4 horas. Controle de Células (CC), Cloreto de sódio (NaCl), Colchicina (COLCH), Mitomicina C (MTMC), Dimetilsulfóxido (DMSO) foram utilizados como controles. Os dados representam a média de triplicatas \pm desvio padrão de dois ensaios independentes (n = 6) ***p < 0,0001 comparado com controle de células seguido de análise <i>One-way</i> ANOVA e teste de Bonferroni.....	38
Figura 15. Microscopia de fluorescência das células Hep G2. É possível observar núcleos (verde), <i>beads</i> (azul) e células inviáveis (vermelho). A. Controle de Células. B. Células tratadas com Mitomicina C por 4 horas. A seta indica a presença de micronúcleos	39

Capítulo 2

Figura 1. Avaliação da citotoxicidade da papaína livre e complexada com β -ciclodextrina e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina sobre células Caco-2 após 48 horas de incubação. CC. Controle de células; PC. Controle Positivo (1% (v/v) de Triton TM X-100); A. papaína livre; B. papaína complexada com β -ciclodextrina; C. papaína complexada com 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina; #. Indica ausência de células. Os dados representam média \pm desvio padrão de dois ensaios independentes (n = 12) *p < 0,0001 comparado ao controle positivo seguido de análise <i>One-way</i> ANOVA e teste de Bonferroni.....	59
Figura 2. Avaliação da citotoxicidade da papaína livre e complexada com β -ciclodextrina e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina sobre células Caco-2 após 8 horas de incubação. CC. Controle de células; PC. Controle Positivo (9% (v/v) de Triton TM X-100); A. Papaína livre; B. Papaína complexada com β -ciclodextrina; C. Papaína complexada com 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina. Os dados representam média \pm desvio padrão de dois ensaios independentes (n = 12) *p < 0,0001 comparado ao controle positivo seguido de análise <i>One-way</i> ANOVA e teste de Bonferroni.....	60
Figura 3. Linearidade da furosemida nas concentrações entre 1 e 100 ng.mL ⁻¹	62
Figura 4. Linearidade da furosemida nas concentrações entre 100 e 1000 ng.mL ⁻¹	63
Figura 5. Linearidade da metoprolol nas concentrações entre 1 e 100 ng.mL ⁻¹	64
Figura 6. Linearidade da metoprolol nas concentrações entre 100 e 1000 ng.mL ⁻¹	65
Figura 7. Valores de RET (Resistência Elétrica Transepitelial) ($\Omega\cdot\text{cm}^2$) em monocamada de células Caco-2 antes e após a exposição por 2 horas das células às amostras de papaína na concentração de 0,7 μM e furosemida na concentração de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. PPN. papaína livre; PPN-β-CD. papaína complexada com β -ciclodextrina; PPN-HP-β-CD. papaína complexada com 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina. Os dados representam média \pm desvio padrão *p < 0,05 seguido de análise <i>Two-way</i> ANOVA e teste de Bonferroni.....	67
Figura 8. Permeabilidade aparente (P_{app}) ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$) da furosemida na concentração de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ isolada e na presença das amostras contendo papaína na concentração de 0,7 μM e	

do metoprolol na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em monocamada de células Caco-2 em pH 7,4 após exposição de 2 horas. **PPN.** papaína livre; **PPN- β -CD.** papaína complexada com β -ciclodextrina; **PPN-HP- β -CD.** papaína complexada com 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina. Os dados representam média \pm desvio padrão *p < 0,01; **p < 0,0001 comparado ao controle negativo (furosemida) seguido de análise *One-way* ANOVA e teste de Bonferroni..... 70

Figura 9. Curva analítica da rodamina 123..... 72

Figura 10. Curva analítica do *Lucifer Yellow* 73

Figura 11. Microscopia de fluorescência confocal de uma monocamada de células Caco-2 sobre insertores do Transwell® cultivadas por 21 dias. **A.** DAPI - azul, marcando núcleos celulares; **B.** Alexa Fluor™ 488 Faloidina - verde, marcando filamentos de actina presentes preferencialmente nas bordas celulares e microvilosidades. **C.** Sobreposição de todas as marcações (*Merged*). Aumento de 63X com óleo de imersão..... 73

Capítulo 3

Figura 1. Avaliação da citotoxicidade da papaína livre e complexada com β -ciclodextrina e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina sobre células Caco-2 após 48 horas de exposição. **A.** papaína livre; **B.** papaína complexada com β -ciclodextrina; **C.** papaína complexada com 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina; **D.** β -ciclodextrina. **E.** 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina. Os dados representam média \pm desvio padrão de dois ensaios independentes (n = 12) 93

Figura 2. Avaliação da Citotoxicidade da papaína livre e complexada com β -ciclodextrina e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina sobre células HT29-MTX após 48 horas de exposição. **A.** papaína livre; **B.** papaína complexada com β -ciclodextrina; **C.** papaína complexada com 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina; **D.** β -ciclodextrina. **E.** 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina. Os dados representam média \pm desvio padrão de dois ensaios independentes (n = 12) 94

Figura 3. Avaliação da citotoxicidade da papaína livre e complexada com β -ciclodextrina e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina sobre células Raji após 48 horas de exposição. **A.** papaína livre; **B.** papaína complexada com β -ciclodextrina; **C.** papaína complexada com 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina; **D.** β -ciclodextrina. **E.** 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina. Os dados representam a média \pm desvio padrão de dois ensaios independentes (n = 12)..... 95

Figura 4. Avaliação da citotoxicidade da papaína livre e complexada com β -ciclodextrina e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina sobre a co-cultura de células Caco-2 e HT29-MTX após 2 horas de exposição. **A.** papaína livre; **B.** papaína complexada com β -ciclodextrina; **C.** papaína complexada com 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina. Os dados representam média \pm desvio padrão de dois ensaios independentes (n = 12) 96

Figura 5. Valores de RET (Resistência Elétrica Transepitelial) ($\Omega.\text{cm}^2$) em monocamada de células Caco-2 e HT29-MTX antes e após a exposição por 2 horas das células às amostras

de papaína na concentração de 0,7 μM e furosemida na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. PPN . papaína livre; PPN-β-CD . papaína complexada com β -ciclodextrina; PPN-HP-β-CD . papaína complexada com 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina. Os dados representam média \pm desvio padrão *p < 0,05 seguido de análise <i>Two-way</i> ANOVA e teste de Bonferroni.....	101
Figura 6. Permeabilidade aparente (P_{app}) (cm.s^{-1}) da furosemida na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ isolada e na presença das amostras contendo papaína na concentração de 0,7 μM e de minicomprimidos de papaína livre e do metoprolol na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em monocamada de células Caco-2 e HT29-MTX em pH 7,4 após exposição de 2 horas PPN . papaína livre; PPN-β-CD . papaína complexada com β -ciclodextrina; PPN-HP-β-CD . papaína complexada com 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina. Os dados representam média \pm desvio padrão *p < 0,05 comparado ao controle negativo (furosemida) seguido de análise de variância <i>One-way</i> ANOVA e teste de Bonferroni	104
Figura 7. Coloração do muco (em azul) produzido pelas células HT29-MTX na co-cultura com as células Caco-2 e Raji fixadas com Metacarn e coradas com <i>Alcian Blue</i> (azul). A. Membrana sem células (Branco). B. Monocamada de células Caco-2 e HT29-MTX	106
Figura 8. Avaliação da morfologia celular por meio de microscopia de fluorescência confocal de uma monocamada de células Caco-2 e HT29-MTX co-cultivadas por 21 dias. A. DAPI - marcando núcleos celulares. B. Alexa Fluor™ 488 Faloidina - marcando filamentos de actina presentes preferencialmente nas bordas celulares e microvilosidades. C. Sobreposição de todas as marcações (<i>Merged</i>). Aumento de 63X com óleo de imersão	107
Figura 9. Identificação de células M por microscopia eletrônica de varredura. As células são identificadas pela ausência ou menor quantidade de microvilosidades em sua superfície apical. A e B são monocamada de células Caco-2 e HT29-MTX co-cultivadas com células Raji por 7 dias. M é uma célula M	107

Lista de Tabelas

Capítulo 1

Tabela 1. Valores de IC_{50} (μM) das amostras de papaína livre (PPN) e complexada (PPN- β -CD e PPN-HP- β -CD) para as linhagens de células provenientes de roedores.....	20
Tabela 2. Valores de IC_{50} (μM) das amostras de papaína livre (PPN) e complexada (PPN- β -CD e PPN-HP- β -CD) para as linhagens de células aderentes provenientes de carcinomas hepáticos e intestinais humanos e fibroblastos humanos.....	28
Tabela 3. Resultados de PIF obtidos dos ensaios de fototoxicidade	34

Capítulo 2

Tabela 1. Condições cromatográficas utilizadas para a quantificação da furosemida e do metoprolol nas amostras obtidas durante os ensaios de permeabilidade.....	54
Tabela 2. Avaliação do parâmetro de seletividade e porcentagens de interferências na sensibilidade do método cromatográfico da furosemida.....	61
Tabela 3. Avaliação dos parâmetros de precisão e exatidão da furosemida.....	62
Tabela 4. Avaliação do parâmetro de seletividade e porcentagens de interferências na sensibilidade do método cromatográfico do metoprolol.....	63
Tabela 5. Avaliação dos parâmetros de precisão e exatidão do metoprolol.....	64
Tabela 6. Permeabilidade aparente (P_{app}) ($cm.s^{-1}$) da furosemida na concentração de 100 $\mu g.mL^{-1}$ isolada e associada às amostras contendo papaína na concentração de 0,7 μM e do metoprolol na concentração de 100 $\mu g.mL^{-1}$ através da monocamada de células Caco-2 em pH 7,4.....	69

Capítulo 3

Tabela 1. Composição dos minicomprimidos de papaína livre	85
Tabela 2. Valores de IC_{50} (μM) das amostras de papaína livre (PPN) e complexada (PPN- β -CD e PPN-HP- β -CD) para as linhagens de células Caco-2 e HT29-MTX e para a co-cultura de células Caco-2 e HT29-MTX.....	97
Tabela 3. Permeabilidade aparente (P_{app}) ($cm.s^{-1}$) da furosemida na concentração de 100 $\mu g.mL^{-1}$ isolada e associada às amostras contendo papaína na concentração de 0,7 μM e minicomprimidos de papaína livre e do metoprolol na concentração de 100 $\mu g.mL^{-1}$ através da monocamada de células Caco-2 e HT29-MTX em pH 7,4	104

Lista de Abreviaturas e Siglas

$\mu\text{g.mL}^{-1}$: micrograma por mililitro

μL : microlitro

$\mu\text{m.s}^{-1}$: micrômetro por segundo

μM : micromolar

Å: ångström

A: área do suporte de cultivo das células

ANOVA: análise de variância

Asp-158: ácido aspártico na posição 158

ATCC: *American Type Culture Collection*

BAPA: *N α -Benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride*

BSA: *bovine serum albumin*

C: Concentração

C₀: concentração inicial do fármaco adicionado no compartimento doador

Caspases: *cysteine-dependent aspartate-specific proteases*

CC: controle de células

cm.s^{-1} : centímetro por segundo

cm^2 : centímetro quadrado

C_{média}: concentração média determinada

CO₂: gás carbônico

COLCH: colchicina

CT: células tratadas

Cys-25: cisteína na posição 25

Da: dalton

DAPI: *4',6'-diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride*

dC/dT: inclinação da curva de concentração *versus* tempo

DMEM: *Dubelcco's Modified Eagle's Medium*

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

DP: desvio padrão

DPBS: tampão fosfato-salino modificado por Dubelcco contendo cálcio e magnésio

DPR (%): desvio padrão relativo em porcentagem

ECACC: *European Collection of Authenticated Cell Cultures*

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

EMA: *ethidium monoazide bromide*

et al.: e outros

FAPESP: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

FDA: *Food and Drug Administration*

FL1: intensidade de fluorescência

FSC: *forward scatter*

g.L⁻¹: grama por litro

g: grama

His-159: histidina na posição 159

HPLC: *High performance liquid chromatography*

HP-β-CD: 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina

IC₅₀: concentração da substância que inibe 50% do crescimento celular

J.cm⁻²: Joule por centímetro quadrado

kDa: kilodáton

LDH: lactato desidrogenase

LY: *lucifer yellow*

m/v: relação de massa sobre volume

M: *microfold*

MA: média da área do pico do cromatograma

MEV: microscopia eletrônica de varredura

mg.mL⁻¹: miligrama por mililitro

mL: mililitro

mM: milimolar

mm: milímetro

MN: micronúcleo

MTMC: mitomicina C

MTT: *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*

MUC2: mucina do tipo 2

n: número

NaCl: cloreto de sódio

NAD⁺: nicotinamida adenina reduzido

NADH: nicotinamida adenina oxidada

ng.mL⁻¹: nanograma por mililitro

nm: nanômetro

NOR: norfloxacino

NR: *neutral red*

°C: grau Celsius

OECD: *Organisation for Economic Co-operation and Development*

p: valor de significância

PAMPA: *parallel artificial membrane permeability assay*

P_{app}: permeabilidade aparente

PBS: tampão fosfato-salino

P-gp: glicoproteína-P

pH: potencial hidrogeniônico

PIF: *Photo Irritation Factor*

PPN: papaína

PPN-HP-β-CD: papaína complexada com β-ciclodextrina

PPN-β-CD: papaína complexada com 2-hidroxipropil- β-ciclodextrina

R: coeficientes de correlação

R²: coeficientes de determinação

RET: resistência transepitelial

ROD123: rodamina 123

rpm: rotações por minuto

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*

TGI: trato gastrointestinal

UFR: unidade de fluorescência relativa

UI: unidade internacional

UI.mL⁻¹: unidade internacional por mililitro

USP-U.mg⁻¹: concentração de atividade enzimática por miligrama

USP-U.mL⁻¹: concentração de atividade enzimática por mililitro

UVA: radiação ultravioleta do tipo A

v/v: relação volume por volume

V_R: volume do compartimento receptor

W: watt

β-CD: β-ciclodextrina

λ_{em}: comprimento de onda de emissão

λ_{ex}: comprimento de onda de excitação

μm: micrômetro

μmHg: micrômetro de mercúrio

Ω.cm²: ohm vezes centímetro quadrado

Lista de Símbolos

%: porcentagem

±: mais ou menos

≥: maior ou igual que

<: menor que

#: ausência de células

®: registrado

°: grau

™: marca registrada

X: aumento

Sumário

Prefácio	1
1. Introdução	2
2. Objetivos	3
2.1 Geral	3
2.2 Específicos	4
Capítulo 1	5
Resumo	6
1. Introdução.....	7
2. Objetivos.....	9
2.1 Geral.....	9
2.2 Específicos	9
3. Materiais e métodos.....	9
3.1 Produção dos complexos de papaína com β -ciclodextrina e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina	9
3.2 Avaliação da atividade proteolítica da papaína livre e complexada com β -ciclodextrina e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina	10
3.3 Cultura celular.....	10
3.4 Ensaio de citotoxicidade	11
3.5 Ensaio de fototoxicidade	12
3.6 Ensaio de genotoxicidade	13
3.7 Análise estatística	15
4. Resultados e discussão	16
4.1 Avaliação da atividade proteolítica da papaína livre e complexada com β -ciclodextrina e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina	16
4.2 Ensaio de citotoxicidade	16
4.3 Ensaio de fototoxicidade	33
4.4 Ensaio de genotoxicidade	35
5. Conclusão.....	41
6. Agradecimentos	41
7. Referências.....	41
Capítulo 2	48
Resumo	49
1.Introdução.....	50

2. Objetivos.....	52
2.1 Geral.....	52
2.2 Específicos	52
3. Materiais e métodos.....	52
3.1 Cultura celular.....	52
3.2 Ensaio de citotoxicidade	52
3.3 Avaliação da liberação de LDH	52
3.4 Validação analítica parcial	53
3.4.1 Seletividade	54
3.4.2 Precisão.....	55
3.4.3 Exatidão.....	55
3.4.4 Linearidade	55
3.5 Avaliação da permeabilidade da furosemida através da monocamada de células Caco-2	55
3.6 Microscopia de fluorescência confocal.....	56
3.7 Análise estatística	57
4. Resultados e discussão	57
4.1 Ensaio de citotoxicidade	57
4.2 Validação analítica parcial	61
4.3 Avaliação da permeabilidade da furosemida através da monocamada de células Caco-2	65
4.4 Microscopia de fluorescência confocal.....	73
5. Conclusão.....	74
6. Agradecimentos	74
7. Referências.....	74
 Capítulo 3	 80
Resumo	81
1. Introdução.....	82
2. Objetivos.....	85
2.1 Geral.....	84
2.2 Específicos	84
3. Materiais e métodos.....	84
3.1 Produção dos minicomprimidos de papaína livre	84
3.2 Ensaio de dissolução de minicomprimidos de papaína livre.....	85
3.3 Cultura celular.....	85
3.4 Ensaio de citotoxicidade	86

3.4.1 Células Caco-2 e HT29-MTX	86
3.4.2 Células Raji.....	86
3.4.3 Co-cultura de células Caco-2 e HT29-MTX.....	87
3.5 Avaliação da permeabilidade da furosemida através da tripla co-cultura de células Caco-2, HT29-MTX e Raji	87
3.6 Coloração do muco com <i>Alcian Blue</i>	89
3.7 Microscopia de fluorescência confocal.....	89
3.8 Microscopia eletrônica de varredura	90
3.9 Análise estatística	90
4. Resultados e discussão	91
4.1 Ensaio de citotoxicidade	91
4.2 Avaliação da atividade enzimática da papaína presente nos minicomprimidos após o ensaio de dissolução	97
4.3 Avaliação da permeabilidade da furosemida através da tripla co-cultura de células Caco-2, HT29-MTX e Raji	97
5. Conclusão.....	107
6. Agradecimentos	108
7. Referências.....	108
 3. Conclusão	 115
 Anexo	 116
Aprovação do comitê de ética.....	116

Prefácio

O presente trabalho foi desenvolvido para contribuir com o conhecimento a cerca da avaliação das características toxicológicas da papaína e também buscar um melhor entendimento de seu papel em atuar como promotora de permeação oral.

Inicialmente, o intuito do trabalho era avaliar a permeabilidade da papaína presente em formulações farmacêuticas elaboradas para administração por via oral, que poderiam ser empregadas para o tratamento de doenças inflamatórias intestinais, tendo em vista os inúmeros benefícios terapêuticos dessa enzima já descritos na literatura. Entretanto, devido ao desafio de se realizar a avaliação de segurança de uma enzima proteolítica e também padronizar o modelo de tripla co-cultura de células intestinais para a avaliação da permeabilidade, optou-se por empregar a papaína como um adjuvante farmacotécnico capaz de promover a permeação de um fármaco de baixa permeabilidade intestinal nesse modelo de cultura de células. Sendo assim, utilizou-se a furosemida como o fármaco de escolha, por apresentar baixa permeabilidade nos modelos tradicionais.

Nesse contexto, o trabalho inicia-se com uma introdução geral, abordando os assuntos voltados ao propósito principal do trabalho, e segue dividido em 3 capítulos.

O Capítulo 1 aborda a caracterização da segurança biológica *in vitro* da papaína com a realização de ensaios de citotoxicidade, fototoxicidade e genotoxicidade. Foram avaliadas as amostras de papaína livre e complexada com β -ciclodextrina e 2-hidroxi-propil- β -ciclodextrina em diferentes concentrações com a finalidade de elucidar o comportamento de toxicidade da enzima frente a diversas linhagens celulares provenientes, principalmente, de diversas seções do trato gastrointestinal humano.

No Capítulo 2 são mostrados os ensaios de citotoxicidade das amostras utilizando a linhagem de células Caco-2 mediante avaliação da integridade mitocondrial e da liberação de LDH. Foi realizado o ensaio permeabilidade da furosemida, um fármaco de baixa permeabilidade oral avaliando o potencial desses compostos em promover a permeação desse fármaco-modelo através da monocamada de células Caco-2.

Por fim, o Capítulo 3 abrange a citotoxicidade dessas amostras na co-cultura de células Caco-2 e HT29-MTX e também o ensaio permeabilidade da furosemida, avaliando o potencial dessas amostras em promover a permeação desse fármaco, entretanto, nesse capítulo é utilizado o modelo de tripla co-cultura de células Caco-2, HT29-MTX e Raji tendo em vista que esse modelo *in vitro* é considerado o mais semelhante à barreira intestinal *in vivo*.

1. Introdução

A papaína é empregada como agente debridante em formulações tópicas para o tratamento de feridas (ROGENSKI *et al.*, 1995). Entretanto, não são observadas formulações orais visando o tratamento de patologias na região do cólon, possivelmente devido à baixa estabilidade de moléculas no trato gastrointestinal (ZULLI *et al.*, 2010). Isso torna em evidência a necessidade de mais pesquisas relacionadas à veiculação de proteínas e peptídeos direcionadas à região colônica para o tratamento de patologias inflamatórias - doença de Crohn e retocolite ulcerativa que acometem essa região (ABRAHAM; CHO, 2009).

Na busca pela estabilização de formas farmacêuticas para uso oral, muitos estudos mostram os benefícios da complexação de fármacos com ciclodextrinas em formulações para uso oral, preservando sua integridade estrutural, conferindo aumento da solubilidade e bioestabilidade e, conseqüentemente, aumento da biodisponibilidade do fármaco (VARCA *et al.*, 2008).

As ciclodextrinas são metabolizadas exclusivamente pela microbiota colônica, originando maltodextrina, maltose e glicose e, posteriormente, gás carbônico e água. Por serem pouco metabolizadas e pouco absorvidas no estômago e no intestino delgado, esse tipo de veiculação pode ser considerado muito interessante para a liberação colônica de fármacos para tratamento de patologias locais (BARATA *et al.*, 2007).

Para a avaliação da permeabilidade e toxicidade de fármacos com liberação gastrointestinal, são empregados diversos modelos utilizando animais, tecidos, segmentos intestinais, membranas e culturas celulares (SOUZA; FREITAS; STORPIRTIS, 2007).

As células Caco-2 são provenientes de um adenocarcinoma de cólon humano e são extensivamente empregadas nos estudos de avaliação da permeabilidade, absorção e citotoxicidade de moléculas que apresentem potencial terapêutico, pois sob condições adequadas, multiplicam-se rapidamente e são capazes de diferenciar-se espontaneamente em enterócitos, formando uma monocamada homogênea de células cilíndricas, polarizadas com microvilosidades na borda apical, aderidas por junções mantendo as características morfológicas e funcionais das células epiteliais intestinais (SOUZA; FREITAS; STORPIRTIS, 2007; NATOLI *et al.*, 2012; WALTER *et al.*, 1996).

Muitos estudos têm correlacionado a permeabilidade de fármacos através das células Caco-2 com a absorção oral e biodisponibilidade (ARTURSSON; KARLSSON, 1991; CHENG; LI; USS, 2008; FERNANDES *et al.*, 2015) e, portanto, esse modelo é considerado o padrão ouro para avaliação da permeabilidade de diversas substâncias (LEE *et al.*, 2015) e preditivo com os modelos de permeabilidade *in vivo* (LENNERNÄS, 1998).

No entanto, o epitélio intestinal é composto por diferentes tipos de células e interações, sendo que os enterócitos e as células caliciformes representam as maiores populações observados nesse epitélio (WALTER *et al.*, 1996). Segundo BÉDUNEAU *et al.* (2014), a

ausência de muco torna-se um fator limitante para o estabelecimento de condições preditivas para a avaliação do comportamento da liberação de fármacos e sua permeabilidade.

As células HT-29 diferenciam-se, após confluência, em uma pequena proporção de células secretoras de muco (células caliciformes ou de Goblet) e células absorptivas (VÁZQUEZ *et al.*, 2013). As células HT29-MTX foram obtidas após adaptação das células HT29 ao tratamento com metotrexato (LESUFFLEUR *et al.*, 1993) e são consideradas uma subpopulação celular estável e homogênea totalmente diferenciada em células secretoras do muco (GAGNON *et al.*, 2013).

Diversos autores estudaram os modelos de co-culturas de células Caco-2 e HT29-MTX a fim de simular as características morfológicas e bioquímicas do epitélio intestinal observadas *in vivo*.

BÉDUNEAU *et al.* (2014) investigaram o desenvolvimento da co-cultura de células Caco-2 e HT29-MTX com o objetivo de avaliar mecanismos de transporte específicos através da membrana intestinal, concluíram que a adição das células HT29-MTX foi fundamental para a formação de uma camada de muco contínua além de simular as variáveis encontradas no epitélio intestinal.

HILGENDORF *et al.* (2000) e ANTOINE *et al.* (2015) também estudaram o modelo de co-cultura de células Caco-2:HT29-MTX e demonstraram a compatibilidade desse modelo nos estudos *in vitro* de permeabilidade intestinal por meio da observação mais realista dos mecanismos celulares analisados *in vivo*.

Além das células produtoras de muco, os linfócitos B também tem uma participação importante na composição desse epitélio. As células Raji são derivadas de linfoma de Burkitt e apresentam características fenotípicas de linfócitos do tipo B. Essas células, quando co-cultivadas com células Caco-2, promovem sua diferenciação em célula M, muito encontrada em determinadas regiões do intestino (ANTUNES *et al.*, 2013).

Na literatura, são observados outros modelos de culturas celulares que foram desenvolvidos para aperfeiçoar a correlação *in vitro/in vivo* dos modelos existentes. Dentre esses, os modelos de co-culturas de células Caco-2, HT-29 e Raji são cada vez mais utilizados para mimetizar com maior precisão a morfofisiologia da parede intestinal (LOZOYA-AGULLO *et al.*, 2017).

2. Objetivos

2.1 Geral

Avaliar *in vitro* a segurança e a capacidade promotora de permeabilidade da papaína livre e complexada com ciclodextrinas empregando a co-cultura de células Caco-2, HT29-MTX e Raji.

2.2 Específicos

- Desenvolver o modelo *in vitro* de tripla co-cultura de células Caco-2, HT29-MTX e Raji e avaliar as condições empregadas e o comportamento celular;
- Verificar a influência da papaína livre e complexada com β -ciclodextrina e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina sobre a monocamada e sua interferência nos processos de permeação;
- Analisar a permeabilidade e a citotoxicidade de diferentes concentrações de papaína livre e complexada utilizando o modelo de tripla co-cultura celular.

Capítulo 1 – Caracterização *in vitro* da segurança biológica

Resumo

A papaína é uma fitoenzima proteolítica empregada em diversas formulações farmacêuticas devido a sua capacidade em promover a cicatrização e a permeação de outros ativos. Embora a papaína seja empregada para diversas finalidades tendo em vista seu amplo potencial terapêutico, ela apresenta baixa estabilidade em formulações farmacêuticas. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a segurança de amostras de papaína livre e complexada com β -ciclodextrina e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina por meio da realização de ensaios de viabilidade celular utilizando as linhagens BALB/c 3T3 clone A31, CHO-K1, HuTu 80, Caco-2, HT-29, HT29-MTX, Hep G2 e fibroblastos humanos; fototoxicidade, utilizando as células BALB/c 3T3 clone A31 e genotoxicidade, utilizando as linhagens CHO-K1 e Hep G2 mediante o ensaio de quantificação da formação micronúcleos *in vitro* por citometria de fluxo. A IC₅₀ (μ M) da papaína livre sobre as células BALB/c 3T3, CHO-K1, Caco-2, HuTu 80, HT-29, HT29-MTX, Raji, Hep G2 e fibroblastos humanos foi de 3,8; 4,9; 1,4; 0,4; 4,5; 2,3; 2,6 e 1,6, respectivamente. A IC₅₀ (μ M) da papaína complexada β -ciclodextrina com sobre as células BALB/c 3T3, CHO-K1, Caco-2, HuTu 80, HT-29, HT29-MTX, Hep G2 e fibroblastos humanos foi de 3,7; 3,5; 1,4; 2,8; 5,3; 1,9; 3,0; 1,8, respectivamente. A IC₅₀ (μ M) da papaína complexada 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina sobre as células BALB/c 3T3, CHO-K1, Caco-2, HuTu 80, HT-29, HT29-MTX, Hep G2 e fibroblastos humanos foi de 4,2; 2,5; 1,3; 3,3; 5,1; 1,8; 2,9; 1,5, respectivamente. As concentrações das amostras papaína, quando empregadas em concentrações acima dos valores de IC₅₀, podem exercer uma ação proteolítica pronunciada sobre células aderentes avaliadas, entretanto, essas amostras não foram capazes de promover citotoxicidade sobre as células de suspensão Raji nas concentrações avaliadas. Na avaliação da fototoxicidade, as amostras não apresentaram PIF (*Photo Irradiation Fator*) maior que 1 e, portanto, não foram consideradas fototóxicas em concentrações inferiores a 0,67 μ M. Na avaliação da genotoxicidade, as amostras também não foram capazes de induzir efeitos genotóxicos sobre as células CHO-K1 e Hep G2 nas concentrações avaliadas. A análise dos resultados foi considerada promissora e isso demonstra a segurança biológica necessária para o desenvolvimento de formulações para administração oral para o possível tratamento de patologias intestinais.

Palavras chave: segurança, eficácia, proteínas terapêuticas, formulações orais, viabilidade celular.

1. Introdução

Atualmente, compostos naturais derivados de plantas, têm sido considerados como uma importante fonte de medicamentos para o tratamento de diversas doenças crônicas, principalmente na terapia anti-inflamatória e oncológica (NEWMAN; CRAGG, 2014).

A papaína (*Enzyme Classification* 3.4.22.2) é uma fitoenzima proteolítica isolada do látex das folhas e dos frutos verdes do mamão (*Carica papaya* L.). Ela é constituída por uma única cadeia polipeptídica composta de 212 resíduos distribuídos entre 2 domínios estabilizados por pontes dissulfeto com massa molecular de 23.350 Da (KAMPHUIS *et al.*, 1984). Esses domínios dobram-se e formam uma fenda sobre a superfície da enzima, onde está localizado o seu sítio catalítico, composto pelos resíduos de aminoácidos cisteína (Cys-25) e histidina (His-159) e ácido aspártico (Asp-158) sendo esse último não fundamental para a ação catalítica da enzima (MÉNARD *et al.*, 1990).

Essa enzima está presente em diversas formulações farmacêuticas que são utilizadas para o tratamento de feridas devido a sua atividade debridante em tecidos desvitalizados para a remoção do tecido necrótico e favorecer a migração de células viáveis da borda da ferida para o centro, promovendo, portanto, o processo de cicatrização (COLLARD; ROY, 2010; MONETTA, 1987; RIBEIRO *et al.*, 2015; ROGENSKI *et al.*, 1995; TELGENHOFF *et al.*, 2007).

De acordo com FLINDT (1979), a papaína não interfere na integridade de tecidos saudáveis, devido a presença de uma antiprotease plasmática - a α 1-antitripsina, uma globulina humana, encontrada somente no tecido sadio que inativa a enzima e impede sua ação proteolítica nesse tecido.

Além de sua atividade cicatrizante, a papaína também é reconhecida por possuir atividade antimicrobiana (MOTTA *et al.*, 2014), antiparasitária (BEHNKE *et al.*, 2008), anti-inflamatória (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003), antiangiogênica (MOHR; DESSER, 2013), antitumoral (SAKALOVÁ *et al.*, 2001), além de promotora de permeação cutânea (LOPES *et al.*, 2008a) e oral (GRABOVAC *et al.*, 2007).

Embora a papaína seja empregada para diversas finalidades tendo em vista sua versatilidade e seu amplo potencial terapêutico, ela apresenta baixa estabilidade em formulações farmacêuticas devido principalmente a fatores como temperatura elevada, presença de água e a presença de metais que podem provocar a autólise e oxidação, promovendo alterações na estrutura da enzima que levam à perda de sua atividade (ZULLI *et al.*, 2010).

Para prolongar sua atividade enzimática, a papaína pode ser estabilizada mediante a imobilização em estruturas lipossômicas (MANOSROI *et al.*, 2012) e em matrizes biopoliméricas como carragena (SANKALIA *et al.*, 2006), hidrogel (NICOLETTI *et al.*, 2017), quitosana (CAHYANINGRUM *et al.*, 2013) e ciclodextrinas (VARCA *et al.*, 2007).

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos que possuem uma cavidade interna hidrofóbica tridimensional capaz de interagir com vários compostos hidrofóbicos proporcionando uma vantagem única para aplicações farmacêuticas (BREWSTER; LOFTSSON, 2007).

Além disso, esses oligossacarídeos são metabolizados exclusivamente pela microbiota colônica, originando maltodextrina, maltose e glicose e, posteriormente, gás carbônico e água. Por serem pouco metabolizadas e pouco absorvidas no estômago e no intestino delgado, esse tipo de veiculação pode ser considerado muito interessante para a liberação colônica de fármacos para tratamento de patologias sistêmicas e locais (BARATA *et al.*, 2007), destacando-se a doença de Crohn e a retocolite ulcerativa que acometem essa região (ABRAHAM; CHO, 2009).

A cavidade interna da ciclodextrina pode interagir com resíduos hidrofóbicos da papaína e essa interação forma complexos de inclusão dinâmicos em meio aquoso que podem contribuir com o possível aumento de sua estabilidade térmica e biológica (VARCA *et al.*, 2010). Entretanto, a avaliação da toxicidade dessas formulações ainda é pouco avaliada e mais estudos devem ser realizados para que se comprove a segurança de sua utilização para administração por via oral.

Segundo MATHIJSEN; SPARREBOOM; VERWEIJ (2014), a toxicidade corresponde à capacidade de determinadas substâncias causarem algum efeito nocivo aos seres vivos. As avaliações de toxicidade abrangem ensaios efetuados nas matérias-primas, formulações em desenvolvimento e produtos acabados, aos quais são aplicados testes *in vivo* e/ou *in vitro*.

Os ensaios *in vitro* utilizando culturas celulares são frequentemente utilizados para avaliação da segurança e eficácia de biomoléculas candidatas a fármacos para determinar se essas podem afetar a viabilidade das células e causar um efeito citotóxico significativo ou algum dano genotóxico (ADAN; KIRAZ; BARAN, 2016; MIZUNO *et al.*, 2017). Entretanto, há uma quantidade limitada de informações a respeito da segurança de formulações terapêuticas contendo papaína ainda mais para administração oral.

O ensaio de citotoxicidade consiste em avaliar a interferência de moléculas no metabolismo celular e na forma de como esses processos podem alterar a sobrevivência, crescimento e viabilidade celular, sendo possível determinar o valor de IC₅₀, ou seja, determinar qual é a concentração da substância que inibe 50% do crescimento celular (GROOTHUIS *et al.*, 2015).

O ensaio de fototoxicidade é usado para identificar o potencial fototóxico da substância testada induzido pela excitação das substâncias ativas após a exposição a luz. O teste avalia a fototoxicidade pela redução da viabilidade celular após exposição das mesmas a substância testada na presença e ausência da luz. As substâncias identificadas por esse teste tem grande

probabilidade de serem fototóxica *in vivo*, tanto após administração sistêmica e distribuição da substância ativa para a pele, quanto por após aplicação tópica direta (LEE *et al.*, 2017).

Outro ensaio de segurança muito importante consiste na avaliação da toxicidade genética, destacando-se o ensaio de micronúcleo *in vitro*, que é uma ferramenta importante para avaliação da frequência de micronúcleos nas células, resultado de danos irreversíveis causados por alterações no material genético das células expostas à agentes potencialmente genotóxicos (OCAMPO *et al.*, 2016).

2. Objetivos

2.1 Geral

O objetivo do presente trabalho foi avaliar *in vitro* a segurança de amostras contendo papaína livre e complexada com β -ciclodextrina e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina.

2.2 Específicos

- Avaliação da citotoxicidade da papaína livre e complexada empregando as linhagens celulares BALB/c 3T3 clone A31, CHO-K1, HuTu 80, Caco-2, HT-29, HT29-MTX, Hep G2, Raji e fibroblastos humanos;
- Avaliação da fototoxicidade utilizando células da linhagem BALB/c 3T3 clone A31;
- Avaliação da genotoxicidade empregando células CHO-K1 e Hep G2.

3. Materiais e métodos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (CEP n° 3157080816 e CAAE n° 08111212200005505).

3.1 Produção dos complexos de papaína com β -ciclodextrina e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina

A produção dos complexos foi realizada em parceria com o aluno de Mestrado Felipe Nambu e com o Prof. Dr. Newton Andréo-Filho, do Laboratório Farmacotécnica e Cosmetologia (processo FAPESP n. 2016/22916-5).

Inicialmente, em uma balança analítica (modelo AY220, Shimadzu®), foram pesados 10,0 g de papaína grau farmacêutico (30.000 USP-U.mg⁻¹) (Merck®) e 5,4 g de β -ciclodextrina (Sigma-Aldrich®) ou 6,6 g de 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (Cavasol® W7 HP Pharma, Wacker Chemie AG), que foram dissolvidos em 500 mL de água ultrapurificada (sistema de purificação de água por osmose reversa, modelo OS20 LZ, Gehaka®) sob agitação constante por 2 horas em temperatura ambiente, sendo o frasco envolvido com papel alumínio para proteção da luz durante todo o processo de formação do complexo.

Posteriormente, a mistura foi congelada a -20°C por um período de 24 horas e liofilizada (liofilizador modelo L108, Liobras) por um período de 7 dias em temperatura de -60°C, vácuo de 36 µmHg. O valor de razão molar da mistura foi de 1:10 (PPN:ciclodextrina, respectivamente).

3.2 Avaliação da atividade proteolítica da papaína livre e complexada com β-ciclodextrina e 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina

A quantificação da atividade enzimática da papaína presente nas amostras de papaína livre e complexada com as ciclodextrinas foi realizada em microplaca de 96 poços utilizando o substrato específico BAPA (*Na-Benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride*, pureza ≥ 98%, Sigma-Aldrich®) (2 mM, em tampão de fosfato de sódio contendo cisteína pH 6,8).

O experimento foi realizado em triplicata a 40°C ± 1°C por 45 minutos e uma solução de ácido acético 30% (v/v) para interromper a reação nos intervalos de tempo definidos. Os valores de absorvâncias foram medidos no comprimento de onda de 410 nm utilizando o leitor de microplacas (modelo Synergy HT, Biotek®) (Adaptado de FERRAZ *et al.*, 2014).

3.3 Cultura celular

BALB/c 3T3 clone A31 (linhagem de fibroblastos de camundongos) (ATCC® CCL-163™), Caco-2 (linhagem de células de adenocarcinoma colorretal) (ATCC® HTB-37™), HuTu 80 (linhagem de células de adenocarcinoma de duodeno) (ATCC® HTB-40™), HT-29 (linhagem de células de adenocarcinoma colorretal) (ATCC® HTB-38™), HT29-MTX (linhagem de células de adenocarcinoma colorretal) (ECACC HT29-MTX-E12 12040401), Hep G2 (linhagem de células de hepatocarcinoma humano) (ATCC® HB-8065™) e fibroblastos humanos foram cultivadas separadamente em meio DMEM (*Dubelcco's Modified Eagle's Medium*) alta glicose (Vitrocell®) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (Vitrocell®), 1% (v/v) de L-Glutamina (Vitrocell®) e 1% (v/v) de solução de antibióticos (10.000 UI.mL⁻¹ de penicilina, 10 mg.mL⁻¹ de estreptomicina e 1 mg.mL⁻¹ de anfotericina B) (Vitrocell®).

CHO-K1 (linhagem de células de ovário de hamster chinês) (ATCC® CCL-61™) e Raji (linhagem de células de suspensão de linfoma de Burkitt) (ATCC® CCL-86™) foram cultivadas em meio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) (Vitrocell®) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (Vitrocell®), 1% (v/v) de L-Glutamina (Vitrocell®) e 1% (v/v) de solução de antibióticos (10.000 UI.mL⁻¹ de penicilina, 10 mg.mL⁻¹ de estreptomicina e 1 mg.mL⁻¹ de anfotericina B) (Vitrocell®).

As células foram incubadas em estufa a 37°C a 5% de CO₂ com umidade controlada (modelo 3425, Thermo Scientific™). O processo de descolamento celular ocorreu pela ação da solução de tripsina (2,5 g.L⁻¹) e EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético (0,38 g.L⁻¹)).

(Vitrocell®). Cada tripsinização foi registrada como uma passagem e os ensaios ocorreram a partir da segunda passagem.

3.4 Ensaio de citotoxicidade

Inicialmente, foram semeadas separadamente 15.10^3 células BALB/c 3T3, CHO-K1, Caco-2, HuTu 80, HT-29, HT29-MTX, Hep G2, fibroblastos humanos e Raji em 100 μL de meio de cultura em microplacas de 96 poços que foram incubadas por 24 horas para adesão das células aderentes.

Após 24 horas, os meios foram removidos e as células foram tratadas em sextuplicata com uma diluição seriada das soluções das amostras recém-preparadas sendo que a concentração variou entre 0,7 e 85,7 μM o que corresponde a 0,02 e 2 mg.mL^{-1} , respectivamente, para as amostras contendo papaína (PPN), papaína complexada com β -ciclodextrina (PPN- β -CD) e papaína complexada com 2-hidropropil- β -ciclodextrina (PPN-HP- β -CD), 8 e 969 μM , o que corresponde a 0,009 e 1,1 mg.mL^{-1} , respectivamente para as amostras de β -ciclodextrina e 7 e 929 μM , o que corresponde a 0,01 e 1,3 mg.mL^{-1} , respectivamente para as amostras de 2-hidropropil- β -ciclodextrina. Seguida da aplicação das amostras, as microplacas foram incubadas por 48 horas (OECD 129, 2010), exceto para as linhagens HuTu 80 e HT-29, que foram incubadas por 24 horas. Após esse período de incubação, foram adicionados 150 μL de meio de cultura, as microplacas foram centrifugadas a 1000 rpm e incubadas por mais 3 horas para estimular a re-adesão das células que por ventura encontravam-se na suspensão, exceto para a linhagens de células Raji, que são células de suspensão.

Posteriormente, para avaliação da viabilidade das células HuTu 80 e HT-29, utilizou-se o corante NR (*Neutral Red*) (*3-Amino-7-dimethylamino-2-methylphenazine hydrochloride*) (Sigma Aldrich®). O NR é um corante catiônico fraco que se difunde facilmente através da membrana celular e se liga eletrostaticamente à matriz aniônica dos lisossomos (BORENFREUND; PUERNER, 1985). O meio de cultura foi removido, foi aplicado 100 μL da solução de NR (50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e as microplacas foram incubadas por 3 horas. Após esse período, a solução de NR foi removida, os poços foram lavados com PBS (tampão fosfato-salino) para então adicionar-se 150 μL da solução de dessorção de NR (49 % (v/v) de água destilada, 50 % (v/v) de álcool etílico P.A e 1 % (v/v) de ácido acético glacial, Labsynth®). Em seguida, as microplacas foram agitadas por 15 minutos e a leitura das absorvâncias foi realizada em espectrofotômetro de microplacas no comprimento de onda de 540 nm (OECD 129, 2010).

Para a avaliação da viabilidade das células Raji, foi utilizado o corante Presto Blue® (Thermo Fisher Scientific) na diluição 1:10. Após a aplicação, as microplacas foram incubadas por 2 horas. Em seguida, as microplacas foram agitadas por 15 minutos e a leitura dos sinais

de intensidade de fluorescência no comprimento de onda λ_{ex} : 530 nm e λ_{em} : 590 nm utilizando o leitor de microplacas (modelo Synergy HT, Biotek®).

Para as demais células, a viabilidade foi avaliada utilizando o MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) (Invitrogen™), conforme descrito anteriormente por MOSMANN (1983), com algumas modificações. O MTT é um sal de tetrazólio de cor amarela e solúvel em água, que é convertido em formazan pela clivagem do anel de tetrazólio pela enzima succinato desidrogenase mitocondrial, um produto insolúvel e de cor púrpura. O produto formazan é impermeável às membranas celulares e, portanto, se acumula dentro de células metabolicamente ativas.

Após a incubação, os meios foram removidos e substituídos por MTT em meio (0,5 mg.mL⁻¹) e as microplacas foram incubadas por 2 horas. Em seguida, os meios foram removidos e os poços foram gentilmente lavados com PBS pH 7,4. Posteriormente, o sobrenadante foi removido e os cristais de formazan foram dissolvidos em 100 µL de isopropanol gelado sob agitação por 15 minutos ao abrigo da luz. Os valores de absorvâncias foram medidos a 570 nm utilizando o leitor de microplacas (modelo Synergy HT, Biotek®).

Para a maioria dos ensaios de citotoxicidade, optou-se por empregar o MTT por ser um dos corantes vitais mais utilizadas entre diversos grupos de pesquisa na realização de ensaios de viabilidade celular além também de apresentar fácil manipulação.

A viabilidade celular foi calculada da seguinte forma: viabilidade celular (%) = (CT / CC) x 100, onde CT é a absorvância das células tratadas e CC absorvância do controle de células.

3.5 Ensaio de fototoxicidade

Primeiramente, foram semeadas separadamente 15.10³ células BALB/c 3T3 em 100 µL de meio de cultura em microplacas de 96 poços que foram incubadas por 24 horas para adesão das células.

Após 24 horas, os meios foram removidos, os os poços foram lavados com DPBS (tampão fosfato-salino modificado por Dubelcco contendo cálcio e magnésio) e as células foram tratadas em sextuplicata com uma diluição seriada das soluções das amostras recém-preparadas sendo que a concentração variou entre 0,01 e 0,67 µM, para as amostras contendo PPN, PPN-β-CD, PPN-HP-β-CD e 1,6 e 200 µM para as amostras de Norfloxacino (NOR) (Sigma-Aldrich®) como controle positivo. As soluções foram preparadas em DPBS ao abrigo da luz imediatamente antes da sua utilização para evitar sua fotoativação ou degradação. Para cada amostra, foram utilizadas 2 microplacas, uma para ser exposta à radiação UVA e outra, mantida ao abrigo da radiação.

Em seguida, as microplacas foram incubadas por 1 hora e decorrido esse tempo, as microplacas foram posicionadas na câmara de fototoxicidade em temperatura ambiente por mais 1 hora, período correspondente a dose de 5 J.cm^{-2} . Ressalta-se que a intensidade da luz UVA da câmara foi qualificada com radiômetro (UV-Meter, Hönle UV Technology) equipado com sensor de UVA, cujo espectro é de 320 a 400 nm.

Após a exposição à radiação, os poços foram novamente lavados com DPBS seguida da adição de meio de cultura e incubadas por 24 horas. A viabilidade celular foi avaliada utilizando o MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) (Invitrogen™), conforme descrito anteriormente por MOSMANN (1983), com algumas modificações. Os valores de absorvâncias foram lidos em 570 nm e os resultados das leituras foram submetidos ao programa Phototox® versão 2.0 (Paris, França) que determinou o valor de *Photo Irritation Factor* (PIF).

O PIF está relacionado com a IC_{50} , ou seja, à concentração de cada substância que inibe 50% da viabilidade celular da microplaca não irradiada e da microplaca irradiada, sendo possível classificar as amostras: não fototóxicas para $\text{PIF} < 2$; provavelmente fototóxica para $2 < \text{PIF} < 5$; ou fototóxica para $\text{PIF} > 5$ (OECD 2004; SPIELMANN *et al.*, 1998).

3.6 Ensaio de genotoxicidade

Inicialmente, foram semeadas separadamente 3.10^3 células CHO-K1 e 5.10^3 células Hep G2 em 100 μL de meio em microplacas de 96 poços que foram incubadas por 24 horas para adesão das células.

Após 24 horas, os meios foram removidos e as células foram tratadas em triplicata com uma diluição seriada das soluções das amostras recém-preparadas sendo que a concentração variou entre 0,3 e 1,3 μM , para as amostras contendo papaína (PPN, PPN- β -CD e PPN-HP- β -CD). Colchicina (COLCH) (Sigma-Aldrich®) ($1,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foi utilizada como controle positivo aneugênico responsável pela alteração do número de cromossomos, pois impede a formação dos pólos do fuso durante a metáfase da mitose; Mitomicina C (MTMC) (Sigma-Aldrich®) ($2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foi utilizada como controle positivo clastogênico responsável pela alquilação do DNA, atuando durante a intérfase resultando na inibição seletiva da síntese de DNA, recombinação e troca de cromátides irmãs); cloreto de sódio 0,9% (m/v) (NaCl) (Sigma-Aldrich®) foi utilizado como controle negativo de genotoxicidade; 5% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich®) foi utilizado como controle positivo de citotoxicidade. As microplacas foram incubadas por 4 horas. Em seguida, os meios foram removidos, os poços foram lavados com PBS pH 7,4 e em seguida foi aplicado 100 μL de meio de cultura. As microplacas foram incubadas por 24 horas.

Posteriormente, as microplacas foram centrifugadas (1500 rpm por 10 minutos), receberam uma solução de corante EMA (*ethidium monoazide bromide*) (Invitrogen™) (8,5

$\mu\text{g.mL}^{-1}$ diluída em PBS pH 7,4 suplementado com 2% (v/v) de soro fetal bovino (Vitrocell®) e foram expostas a uma fonte de luz de led azul (440-450 nm, 30 W) por 30 minutos para a fotoativação do composto, que foi irreversivelmente associada apenas ao DNA de células não viáveis. Este procedimento teve como objetivo marcar as células que não deveriam ser incluídas na contagem de núcleos e micronúcleos. Após este passo, as células receberam PBS pH 7,4 com 2% (v/v) de soro fetal bovino (Vitrocell®) e foram centrifugadas para remoção de corante livre.

Foram realizados dois passos de lise para liberar núcleos e micronúcleos e marcar o DNA. O primeiro passo consistiu em lise das células utilizando uma solução com cloreto de sódio (Sigma-Aldrich®) ($0,854 \text{ mg.mL}^{-1}$), citrato de sódio (Sigma-Aldrich®) ($1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$) e IGEPAL® (Sigma-Aldrich®) ($0,3 \text{ }\mu\text{L.mL}^{-1}$), bem como corante fluorescente SYTOX™ Green (Invitrogen™) ($0,8 \text{ }\mu\text{M}$). Após a lise por 60 minutos a 37°C , as placas foram centrifugadas novamente e receberam a segunda solução de lise (sacarose $85,6 \text{ mg.mL}^{-1}$, ácido cítrico 15 mg.mL^{-1} (Sigma-Aldrich®), SYTOX™ Green (Invitrogen™) ($0,4 \text{ }\mu\text{M}$) e suplementada com $5 \text{ }\mu\text{L}$ de microesferas fluorescentes - *beads* (Invitrogen™) que foram utilizadas como padrão interno para o referido cálculo de micronúcleos, garantindo a precisão da realização do ensaio.

Durante 30 minutos, o material permaneceu em temperatura ambiente para a posterior análise automatizada por citometria de fluxo (BD Accuri™ C6, BD Biosciences).

A análise seguiu a metodologia descrita por BRYCE *et al.* (2007). Resumidamente, os eventos marcados com EMA (debris celulares e os fragmentos nucleares resultado de células apoptóticas e necróticas) foram excluídos da contagem total. Isto permitiu a discriminação de núcleos e micronúcleos de células viáveis como partículas coradas individualmente com SYTOX™ Green, que foram avaliados de acordo com seu tamanho (FSC) e intensidade de fluorescência (FL1) bem definidos. Pelo menos 20.000 eventos foram contados na região dos núcleos para cada amostra.

A avaliação da presença em porcentagem de micronúcleos foi definida levando-se em consideração as partículas EMA⁻ e SYTOX⁺, em relação ao controle de células (células não tratadas). A relação entre núcleos e *beads* foi usada para analisar se houve ou não uma proliferação celular e a estratégia de *gating* para as análises pode ser vista na Figura 1

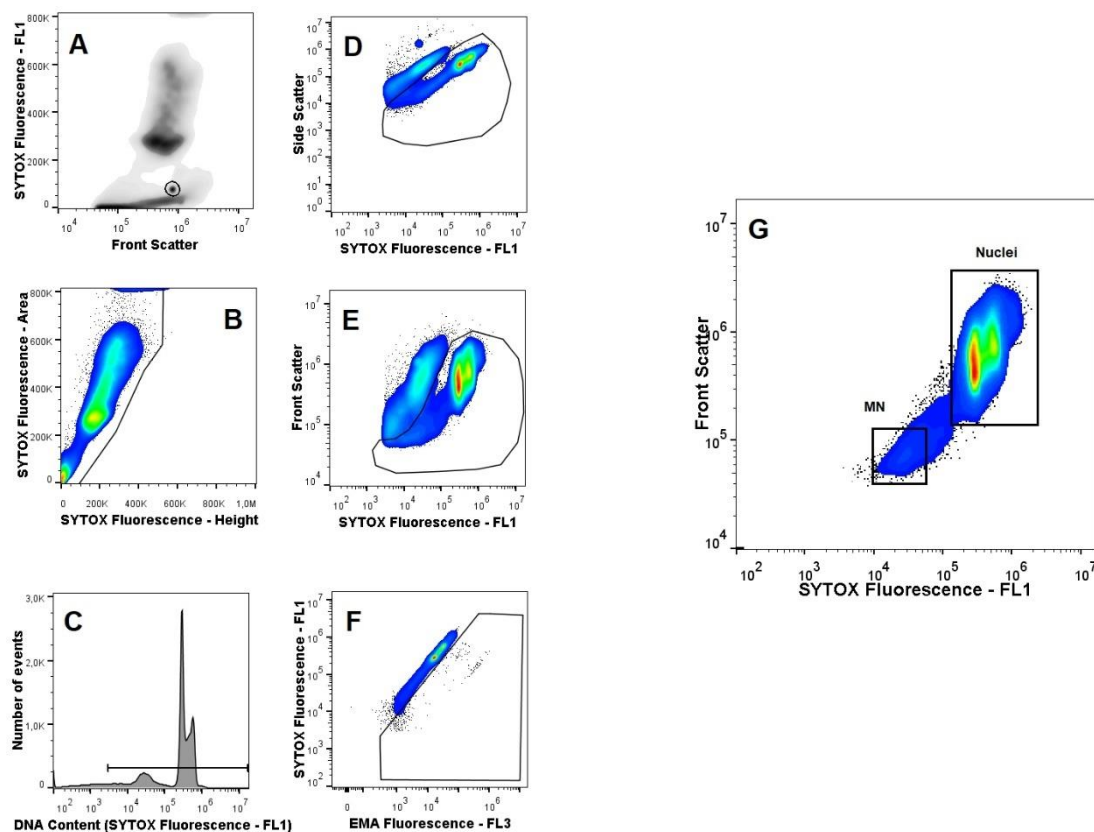


Figura 1. Estratégias de *gating* para as análises. **A.** Quantificação das *beads* (círculo) utilizadas para análise quantitativa de núcleos; **B.** Exclusão de agregados nucleares (*doublets*); **C.** Discriminação de eventos com fluorescência igual ou maior a 1/100 do pico de menor fluorescência (núcleos em G0/G1); **D e E.** Discriminação por complexidade e tamanho dos eventos em relação à fluorescência, respectivamente; **F.** Remoção de eventos relacionado a células inviáveis (EMA⁺); **G.** análise final, delimitando os eventos relacionados a núcleos e a micronúcleos.

3.7 Análise estatística

Os ensaios foram realizados em duplicatas independentes e os resultados foram submetidos à análise *One-way* ANOVA e teste de Bonferroni para determinação de diferenças estatísticas entre os grupos de amostras e os controles ao nível de significância de 5% utilizando o programa *GraphPad Prism* versão 7.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

4. Resultados e discussão

4.1 Avaliação da atividade proteolítica da papaína livre e complexada com β -ciclodextrina e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina

A determinação da atividade enzimática é um dos parâmetros mais importantes a ser estimado a fim de assegurar a manutenção da atividade terapêutica da enzima durante as etapas iniciais de produção e desenvolvimento de um medicamento (SHARMA; SHARMA; MAJUMDAR, 2014).

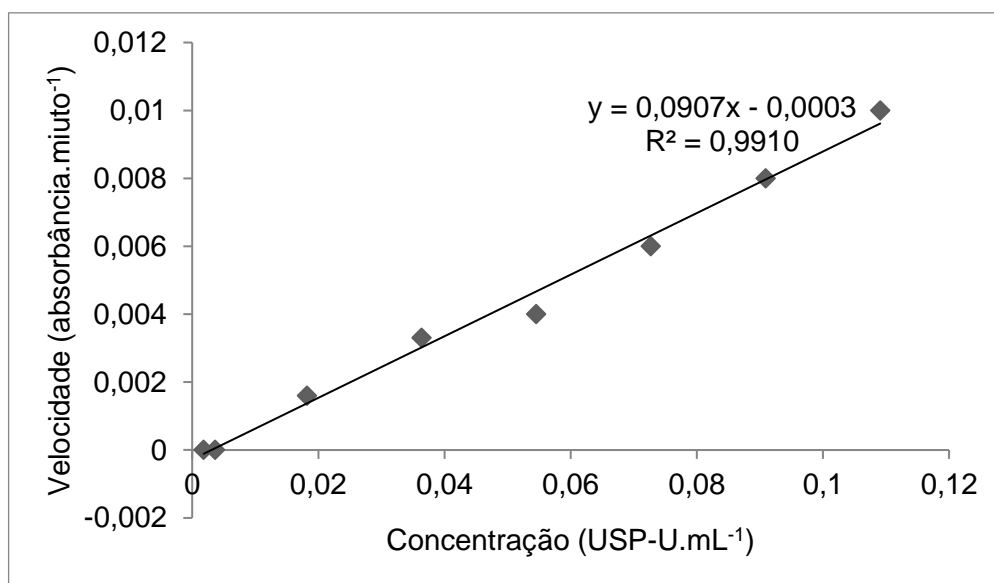


Figura 2. Curva analítica da atividade enzimática da papaína.

A equação da reta mostrada na curva analítica (Figura 2) foi empregada para o cálculo da atividade enzimática da papaína presente nos complexos. A amostra de papaína complexada β -ciclodextrina apresentou atividade de 83,2% e a amostra de papaína complexada com 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina foi de 93,0%. Embora a atividade da enzima tenha sido elevada, é possível que a papaína tenha sua atividade reduzida durante as etapas de produção dos complexos tendo em vista que a papaína é uma enzima muito sensível que apresenta baixa estabilidade sob determinadas condições.

4.2 Ensaio de citotoxicidade

Atualmente uma nova tendência farmacêutica é a administração oral de peptídeos e proteínas (LUNDQUIST; ARTURSSON, 2016). Tal fato leva a necessidade de se avaliar a segurança de formulações contendo proteínas candidatas à fármacos para aplicação terapêutica.

As linhagens de células imortalizadas estão disponíveis a partir de uma variedade de espécies, incluindo seres humanos, e são facilmente mantidas em cultura, por isso são

preferencialmente consideradas para utilização em estudos *in vitro*. Segundo SOUZA; FREITAS; STORPIRTIS, (2007), essas linhagens são amplamente utilizadas nos ensaios não clínicos *in vitro* preliminares para avaliação de segurança e eficácia de moléculas candidatas a fármacos.

Para iniciar a elucidação do perfil de segurança dos complexos, foram realizados ensaios de citotoxicidade em nove linhagens celulares, sendo duas de roedores e sete de origem humana.

As linhagens de camundongo (BALB/c 3T3 e CHO-K1) (Figuras 3 e 4) foram empregadas visando um parâmetro de comparação com a OECD 129 (2010) que preconiza a utilização da BALB/c 3T3 nos ensaios de citotoxicidade. A linhagem CHO-K1 foi utilizada por ser preconizada para a realização dos ensaios de genotoxicidade (OECD 487, 2016).

As linhagens humanas (Caco-2, HuTu 80, HT-29, HT29-MTX, HepG2 e Raji) (Figuras 5-11) foram utilizadas por representarem secções do trato gastrointestinal e os fibroblastos humanos foram utilizados para avaliar a segurança dos complexos caso seja desenvolvida uma aplicação para uso tópico.

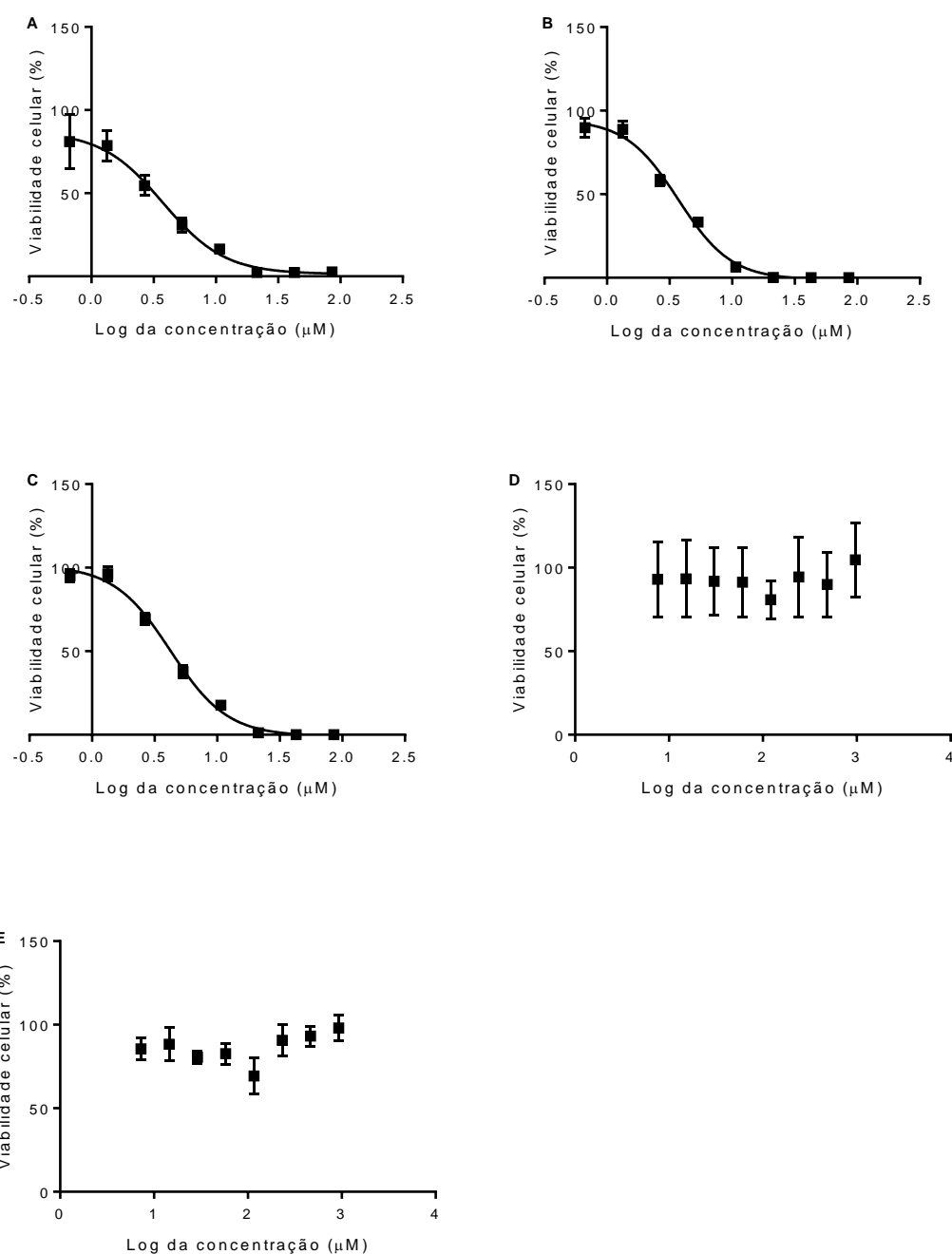


Figura 3. Avaliação da citotoxicidade da papaína livre e complexada com β -ciclodextrina e 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina sobre fibroblastos BALB/c 3T3 após 48 horas de incubação. **A.** papaína livre; **B.** papaína complexada com β -ciclodextrina; **C.** papaína complexada com 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina; **D.** β -ciclodextrina. **E.** 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina. Os dados representam a média de seis replicatas \pm desvio padrão de dois ensaios independentes ($n = 12$).

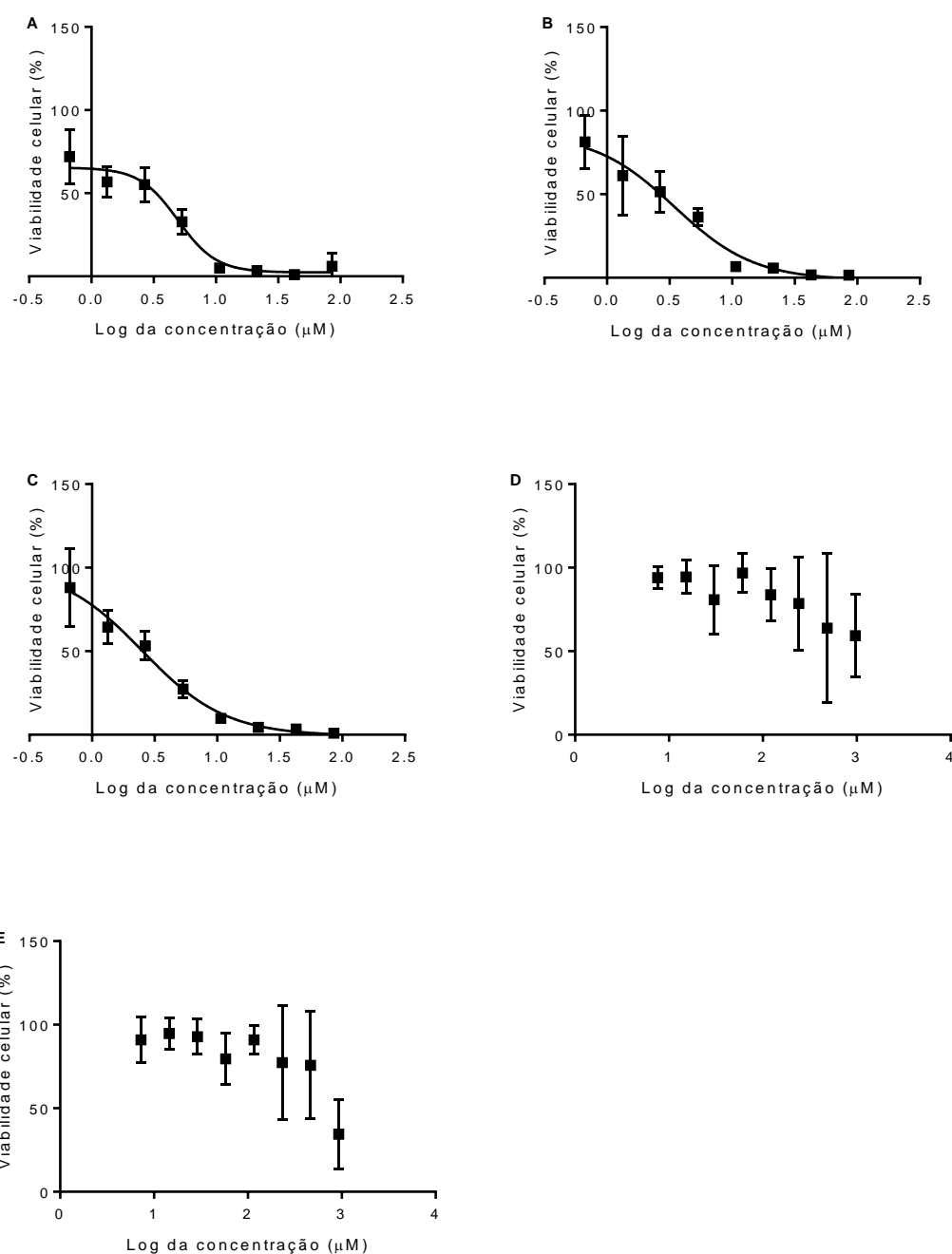


Figura 4. Avaliação da citotoxicidade da papaína livre e complexada com β -ciclodextrina e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina sobre células CHO-K1 após 48 horas de incubação. **A.** papaína livre; **B.** papaína complexada com β -ciclodextrina; **C.** papaína complexada com 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina; **D.** β -ciclodextrina. **E.** 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina. Os dados representam a média \pm desvio padrão de dois ensaios independentes ($n = 12$).

Na Tabela 1, são encontrados os valores determinados de IC_{50} para as amostras de papaína livre e complexada com β -CD e HP- β -CD para as linhagens de células aderentes de roedores. Observa-se que a β -CD e a HP- β -CD não apresentaram citotoxicidade nas concentrações avaliadas, portanto não sendo possível o cálculo da IC_{50} .

Tabela 1. Valores de IC_{50} (μ M) das amostras de papaína livre (PPN) e complexada (PPN- β -CD e PPN-HP- β -CD) para as linhagens de células provenientes de roedores.

Linhagem Celular	IC_{50} (μ M)				
	PPN	PPN- β -CD	PPN-HP- β -CD	β -CD	HP- β -CD
BALB/c 3T3	3,8	3,7	4,2	-	-
CHO-K1	4,9	3,5	2,5	-	-

PPN: papaína livre; PPN- β -CD: papaína complexada com β -ciclodextrina; PPN-HP- β -CD: papaína complexada com 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina; β -CD: β -ciclodextrina; HP- β -CD: 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina.

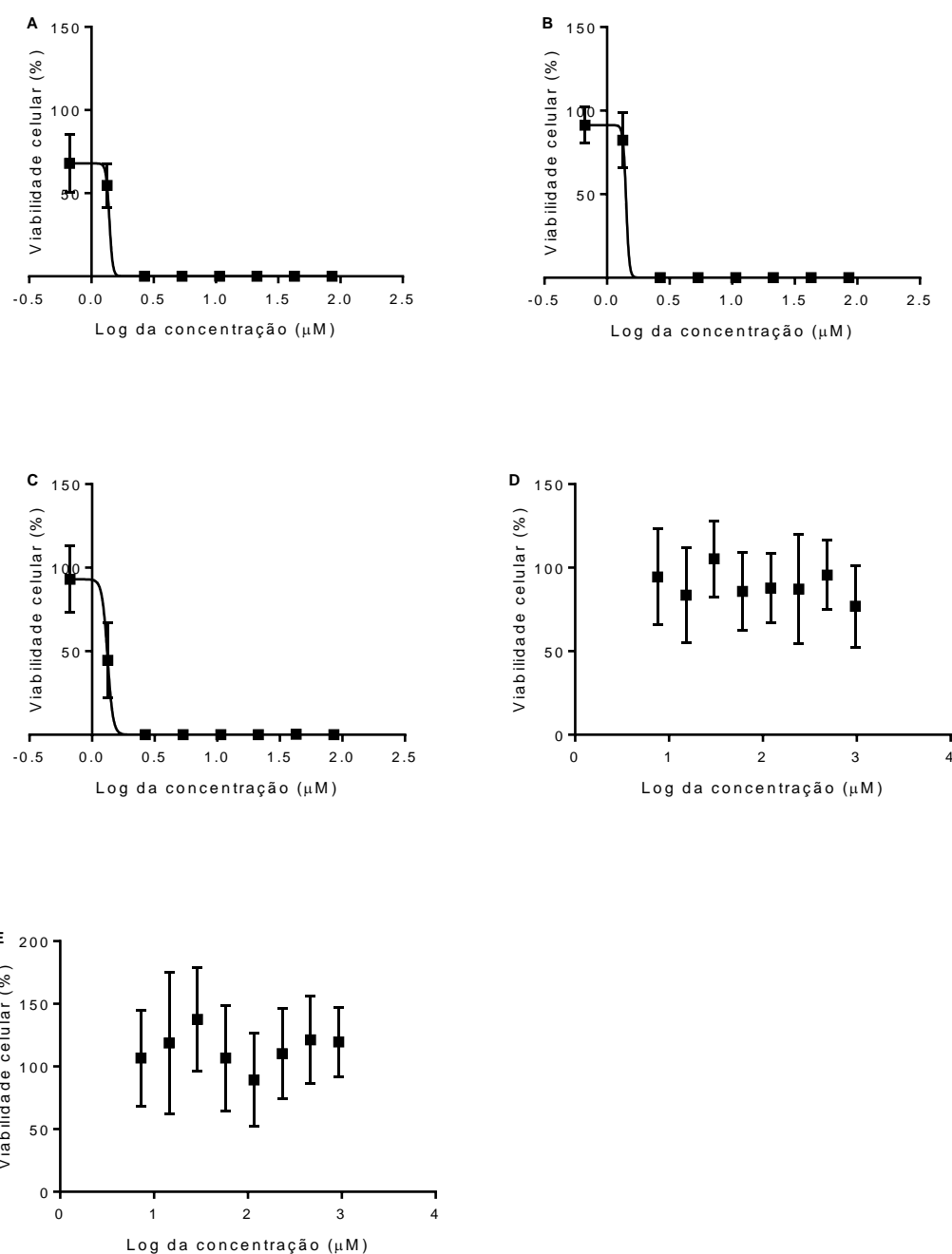


Figura 5. Avaliação da citotoxicidade da papaína livre e complexada com β -ciclodextrina e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina em Caco-2. **A.** papaína Livre; **B.** papaína complexada com β -ciclodextrina; **C.** papaína complexada com 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina; **D.** β -ciclodextrina. **E.** 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina. Os dados representam média \pm desvio padrão de dois ensaios independentes ($n = 12$).

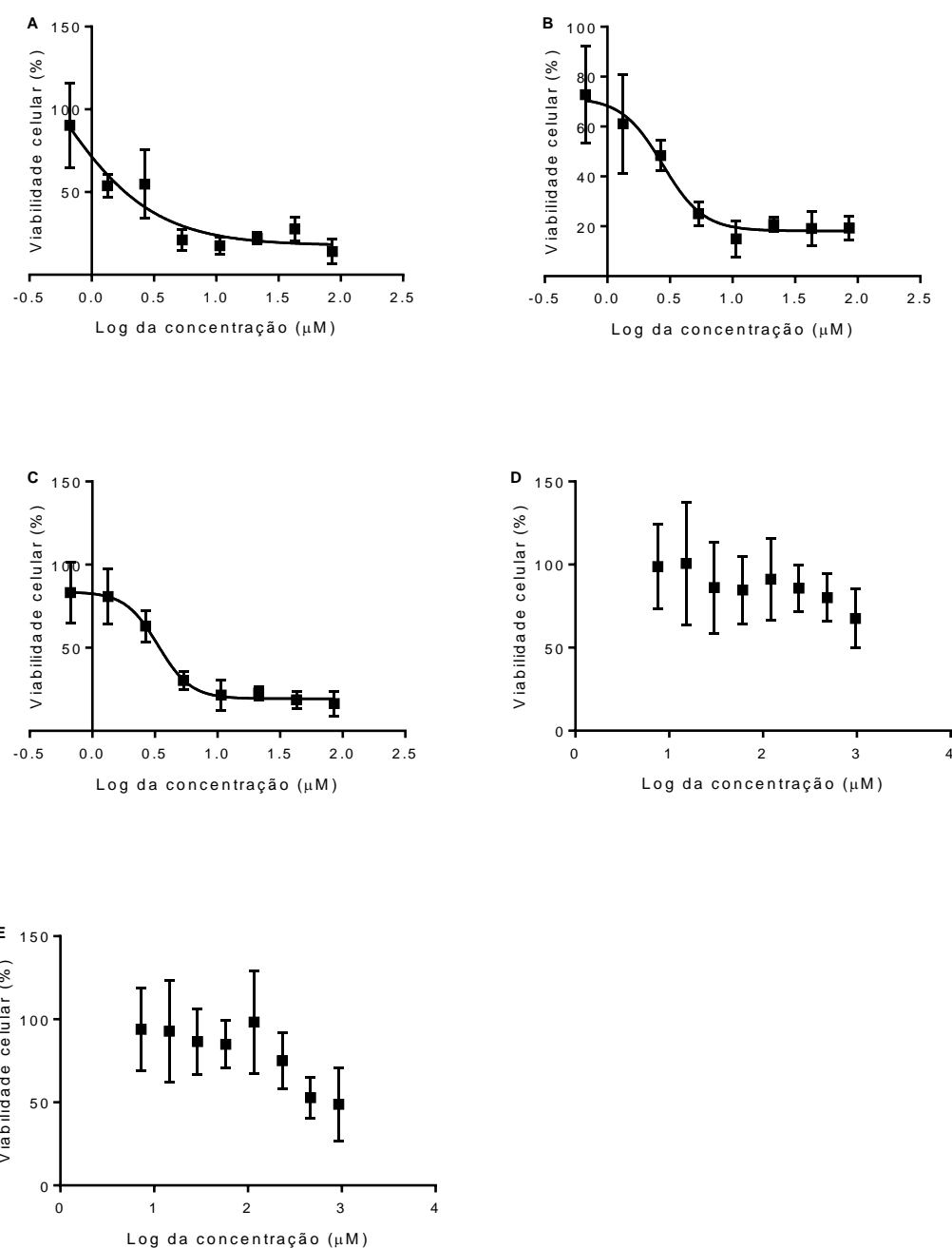


Figura 6. Avaliação da citotoxicidade da papaína livre e complexada com β -ciclodextrina e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina em HuTu 80. **A.** papaína Livre; **B.** papaína complexada com β -ciclodextrina; **C.** papaína complexada com 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina; **D.** β -ciclodextrina. **E.** 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina. Os dados representam média \pm desvio padrão de dois ensaios independentes (n = 12).

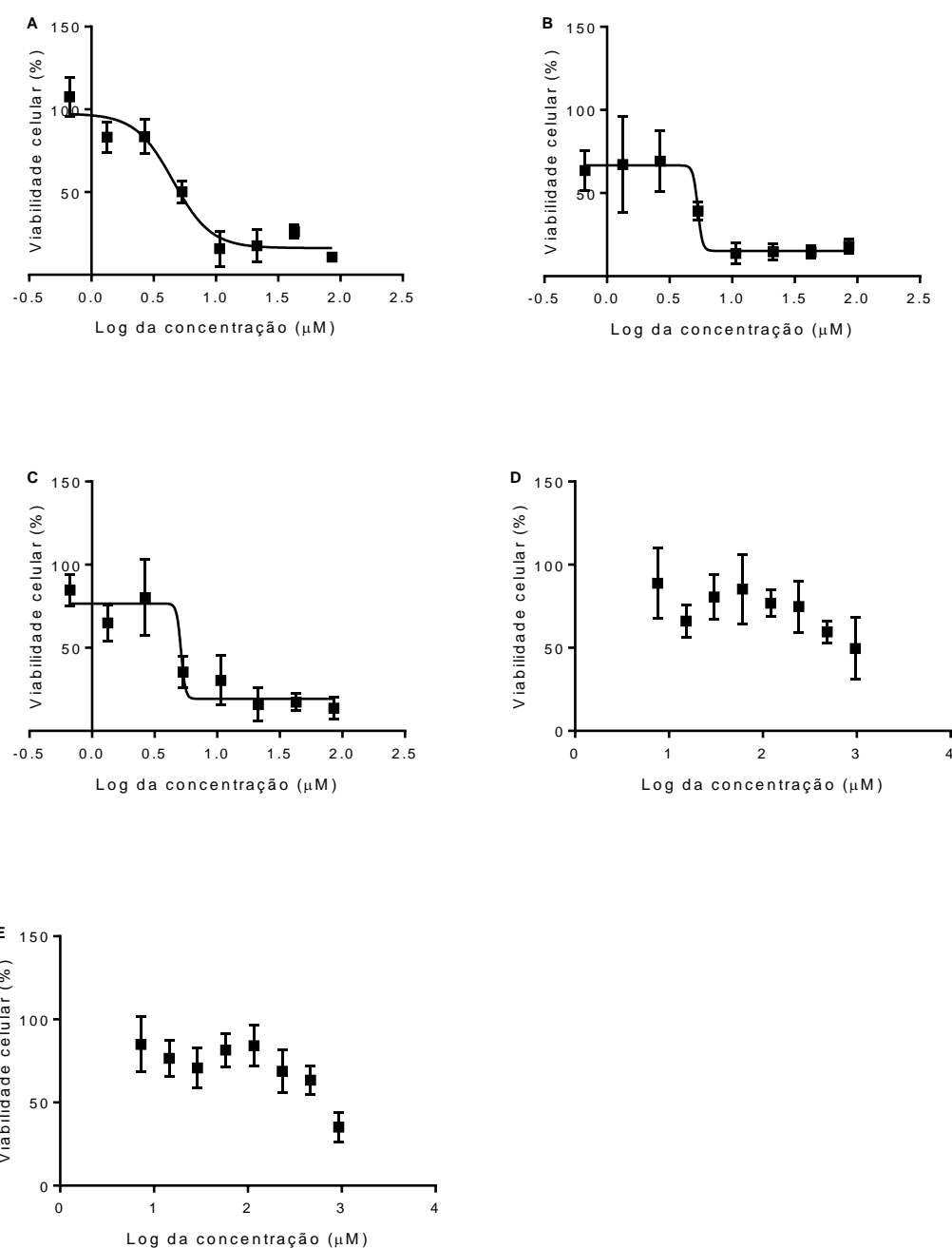


Figura 7. Avaliação da citotoxicidade da papaína livre e complexada com β -ciclodextrina e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina em HT-29. **A.** papaína Livre; **B.** papaína complexada com β -ciclodextrina; **C.** papaína complexada com 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina; **D.** β -ciclodextrina. **E.** 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina. Os dados representam média \pm desvio padrão de dois ensaios independentes ($n = 12$).

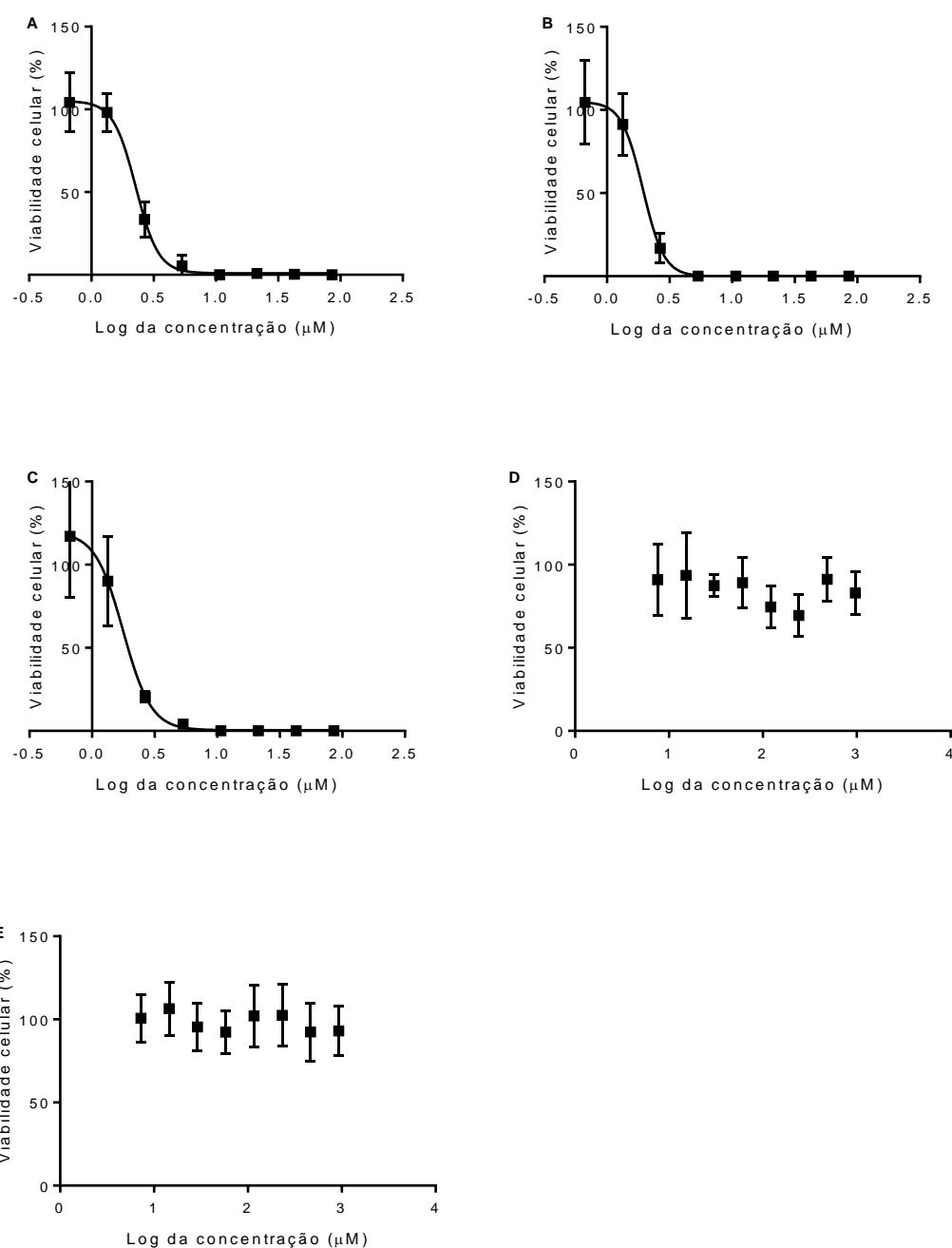


Figura 8. Avaliação da citotoxicidade da papaína livre e complexada com β-ciclodextrina e 2-hidroxiopropil-β-ciclodextrina em HT29-MTX. **A.** papaína Livre; **B.** papaína complexada com β-ciclodextrina; **C.** papaína complexada com 2-hidroxiopropil-β-ciclodextrina; **D.** β-ciclodextrina. **E.** 2-hidroxiopropil-β-ciclodextrina. Os dados representam média ± desvio padrão de dois ensaios independentes (n = 12).

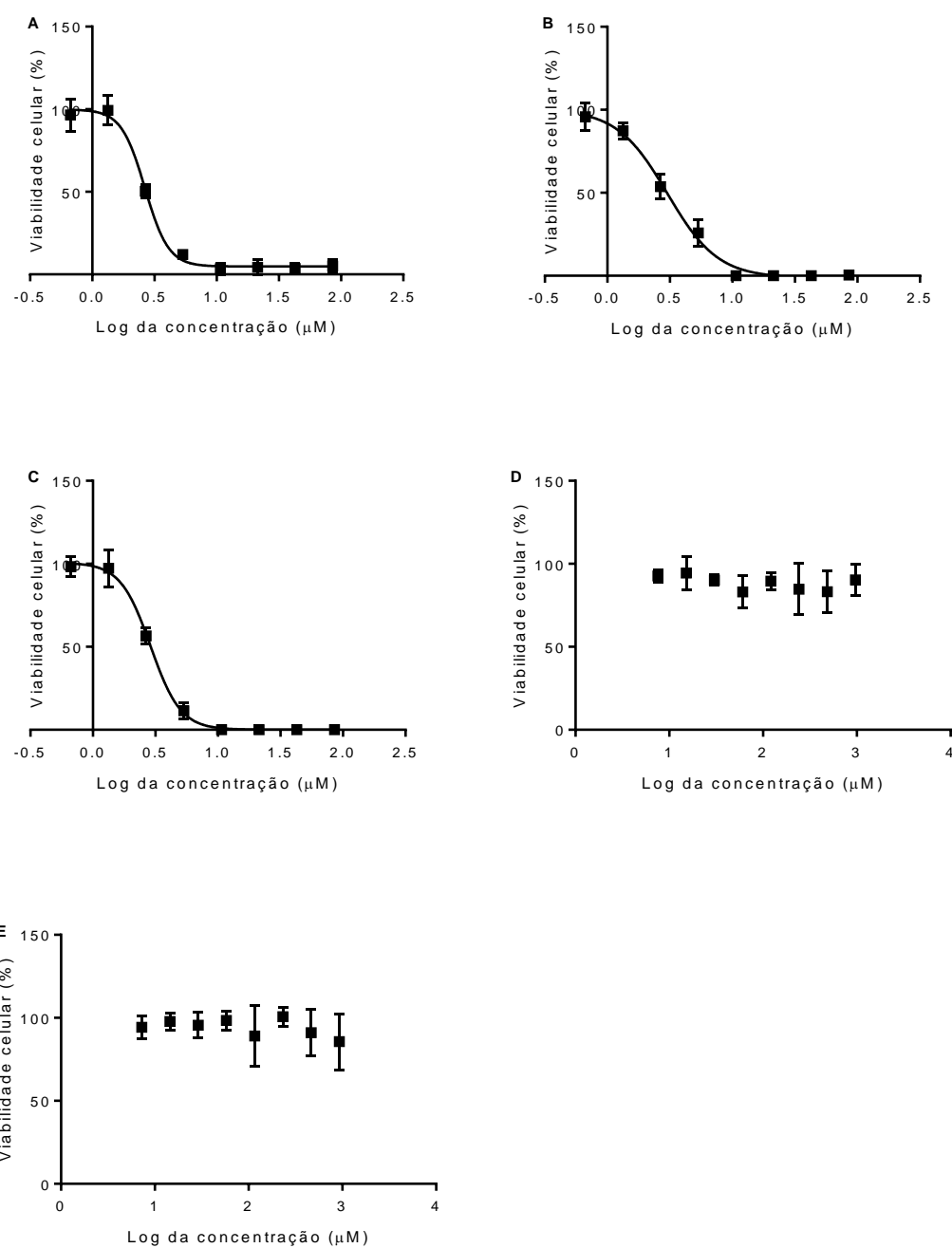


Figura 9. Avaliação da citotoxicidade da papaína livre e complexada com β -ciclodextrina e 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina em Hep G2. **A.** papaína Livre; **B.** papaína complexada com β -ciclodextrina; **C.** papaína complexada com 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina; **D.** β -ciclodextrina. **E.** 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina. Os dados representam média \pm desvio padrão de dois ensaios independentes ($n = 12$).

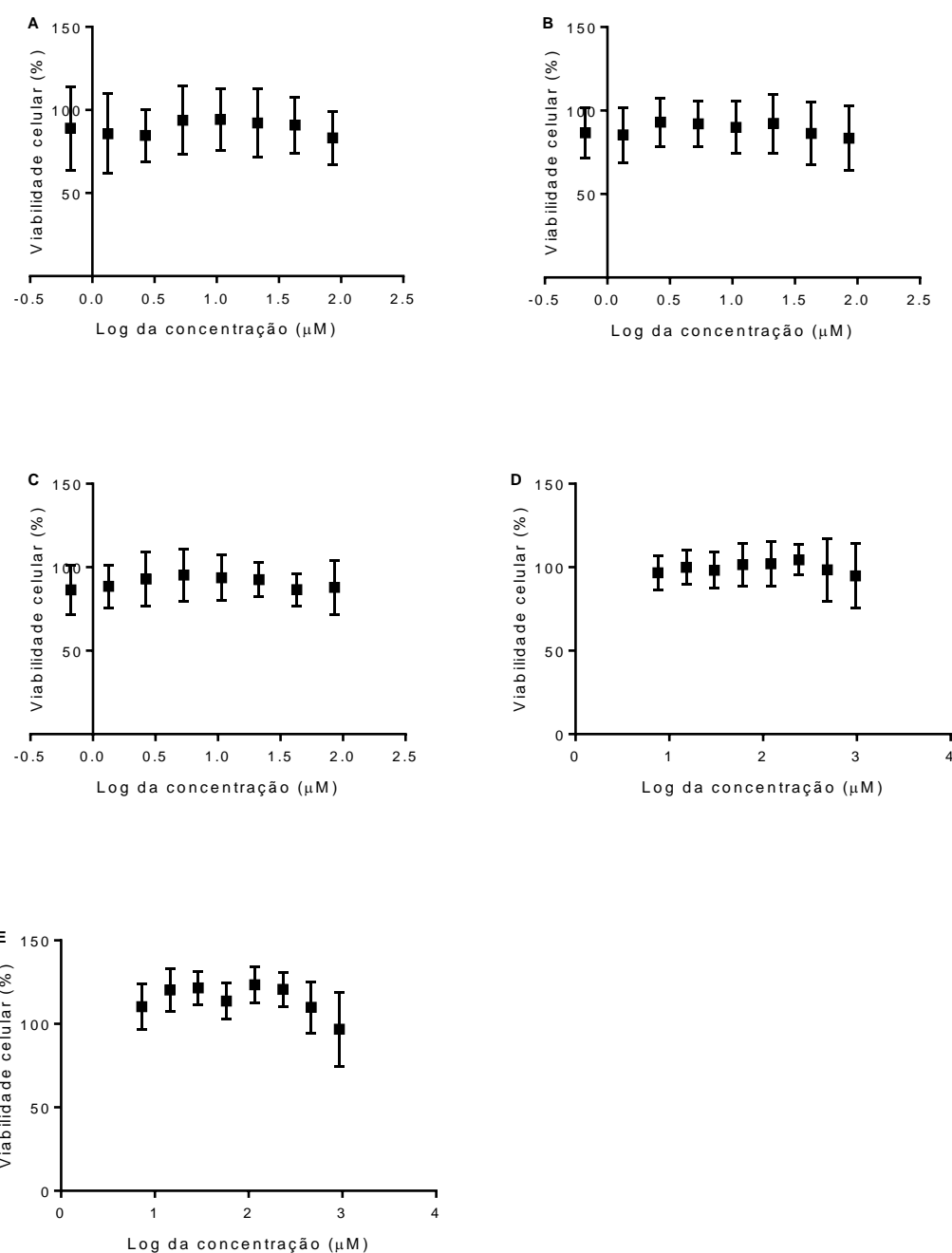


Figura 10. Avaliação da citotoxicidade da papaína livre e complexada com β -ciclodextrina e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina em Raji. **A.** papaína Livre; **B.** papaína complexada com β -ciclodextrina; **C.** papaína complexada com 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina; **D.** β -ciclodextrina. **E.** 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina. Os dados representam média \pm desvio padrão de dois ensaios independentes (n = 12).

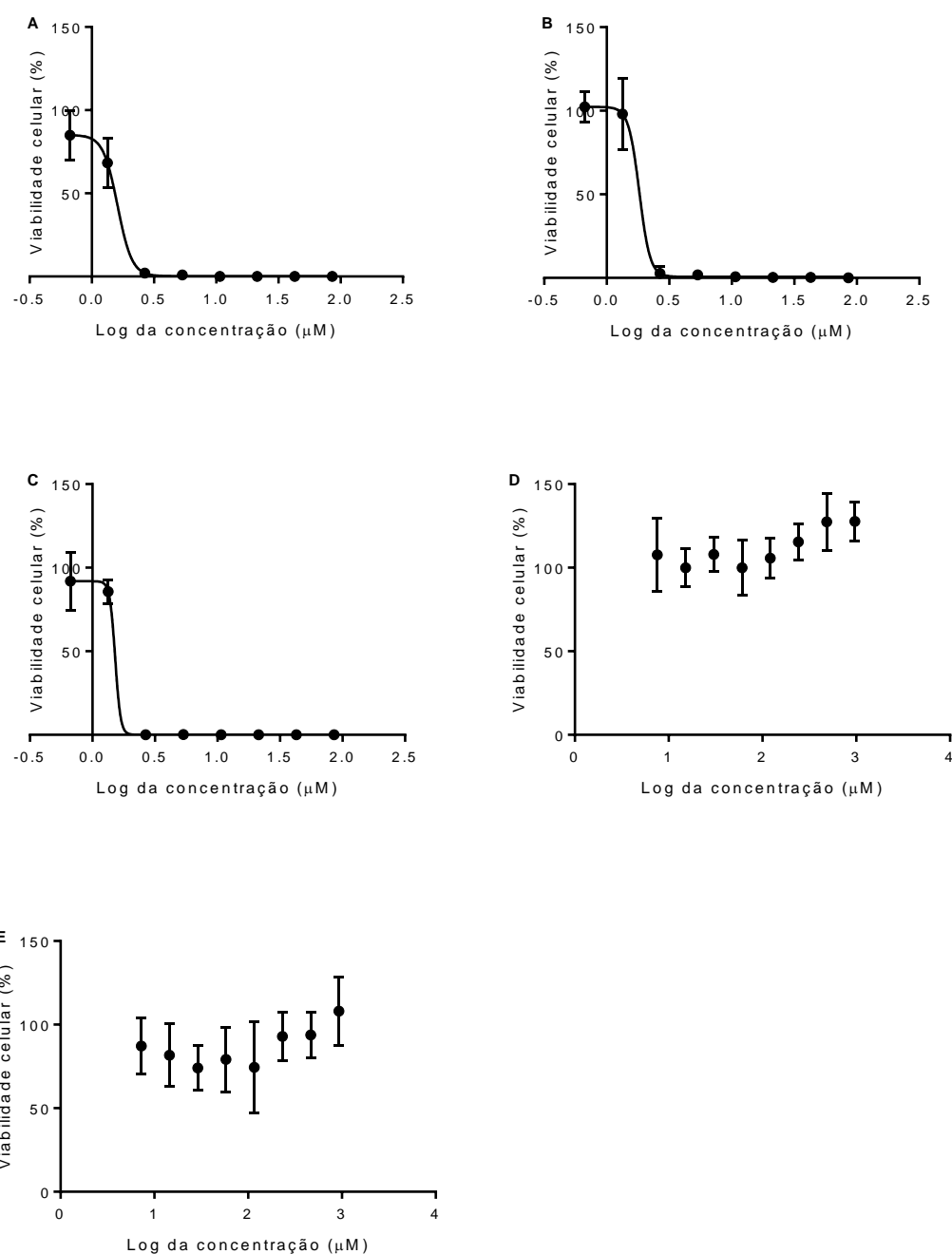


Figura 11. Avaliação da citotoxicidade da papaína livre e complexada com β -ciclodextrina e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina em fibroblastos humanos. **A.** papaína Livre; **B.** papaína complexada com β -ciclodextrina; **C.** papaína complexada com 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina; **D.** β -ciclodextrina. **E.** 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina. Os dados representam média \pm desvio padrão de dois ensaios independentes ($n = 12$).

Tabela 2. Valores de IC₅₀ (μM) das amostras de papaína livre (PPN) e complexada (PPN-β-CD e PPN-HP-β-CD) para as linhagens de células aderentes provenientes de carcinomas hepáticos e intestinais humanos e fibroblastos humanos.

Linhagem Celular	IC ₅₀ (μM)				
	PPN	PPN-β-CD	PPN-HP-β-CD	β-CD	HP-β-CD
Caco-2	1,4	1,4	1,3	-	-
HuTu 80	0,4	2,8	3,3	-	-
HT-29	4,5	5,3	5,1	-	-
HT29-MTX	2,3	1,9	1,8	-	-
Hep G2	2,6	3,0	2,9	-	-
Fibroblastos humanos	1,6	1,8	1,5	-	-

PPN: papaína livre; PPN-β-CD: papaína complexada com β-ciclodextrina; PPN-HP-β-CD: papaína complexada com 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina; β-CD: β-ciclodextrina; HP-β-CD: 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina.

Ao analisar os resultados obtidos nos experimentos de citotoxicidade utilizando linhagens de células humanas (Figuras 5-11) é possível verificar que dentre essas, a mais suscetível à papaína livre é a HuTu 80, à papaína complexada com β-ciclodextrina e 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina é a Caco-2. No geral, a papaína livre foi mais citotóxica à todas as linhagens humanas comparando-se à papaína complexada com as diferentes ciclodextrinas.

Em comparação com os valores de IC₅₀ para as linhagens de células humanas (Tabela 2), é possível observar que as linhagens de roedores são menos susceptíveis à ação da papaína.

Ainda é possível visualizar um perfil de citotoxicidade dose-dependente, cujo o aumento da concentração de papaína é diretamente proporcional ao efeito citotóxico observado, ou seja, as amostras contendo papaína podem alterar a viabilidade celular em concentrações acima dos valores de IC₅₀ quando as células empregadas são expostas por 48 horas às amostras, de acordo com as diretrizes recomendadas pela OECD 129 (2010).

Além da relação de dose-dependência da ação proteolítica da papaína sobre as células, o tempo de exposição também é fundamental para o efeito citotóxico de compostos contendo papaína complexada com ciclodextrina.

VARCA *et al.* (2007) realizou ensaios de citotoxicidade de formulações utilizando queratinócitos humanos e comparou os tempos de exposição de 24 e 48 horas e foi concluído que a papaína complexada possui um comportamento mais citotóxico em 48 horas.

MÜLLER *et al.* (2016) avaliaram o efeito antitumoral e a capacidade de indução da apoptose da papaína nas concentrações de 25, 40 e 100 μM sobre células de colangiocarcinoma intra e extrahepáticos e perceberam que houve uma diminuição da proliferação celular em 24, 48, 72 e 96 horas e que o um efeito citotóxico e apoptótico mais pronunciado foi observado em 96 horas, empregando-se a concentração de 100 μM .

A adesão celular é importante para união entre uma célula e outra e também à matriz extracelular, sendo considerada fundamental para a manutenção da estabilidade de sua estrutura organizacional e integridade do tecido. Em condições fisiológicas, as células aderentes expressam uma série de proteínas tais como caderinas e selectinas, que são moléculas que dependem da presença de cálcio para uma interação adequada célula-célula e integrinas e imunoglobulinas, que são moléculas que não necessitam de cálcio (GUMBINER, 1996).

As caspases (*cysteine-dependent aspartate-specific proteases*) pertencem à família das cisteínas proteases e têm a capacidade de reconhecer e clivar substratos que possuam resíduos de aspartato sinalizando para apoptose. As caspases clivam esses substratos que levam à condensação e fragmentação nuclear, externalização de fosfolipídios de membrana que irão sinalizar para estas células serem fagocitadas por macrófagos (GALLUZZI *et al.*, 2007).

Na ausência de adesão à matriz extracelular, as células sofrem um tipo de apoptose, denominado *anoikis*. O início desse tipo de morte celular pode ser desencadeado por disfunções mitocondrias (via intrínseca) ou pela ativação de determinados receptores localizados na membrana celular (via extrínseca) que são responsáveis pela ativação de caspases e posteriormente de endonucleases e da fragmentação do DNA, culminando na morte celular (PAOLI; GIANNONI; CHIARUGI, 2013).

STREMNITZER *et al.* (2015) afirma também que a papaína é responsável pela degradação de diversas proteínas de junções celulares de queratinócitos humanos além de induzir vasodilatação.

O mecanismo de ação da papaína está relacionado principalmente à clivagem de ligações peptídicas entre os grupos carboxílicos dos aminoácidos lisina e arginina e de resíduos adjacentes (BABU, 2013).

Esse mecanismo pode ser inibido pela presença de metais tais como cádmio, mercúrio e zinco. Provavelmente, esses metais podem reagir com resíduos hidrofóbicos de forma inespecífica (HOMAEI, 2015) e também com grupos sulfidrilas presentes nas pontes dissulfeto que estabilizam a estrutura terciária da papaína, alterando sua conformação e, portanto, inibindo a atividade dessa enzima.

Entretanto, alguns outros metais divalentes podem aumentar a atividade catalítica da enzima. KAUL; SATHISH; PRAKASH (2002) avaliaram o efeito dos íons cálcio e magnésio em aumentar da atividade enzimática da papaína e por meio da realização de ensaios de estabilidade térmica concluíram que ambos os metais são capazes de atuar como cofatores enzimáticos e podem melhorar a atividade da papaína, devido a coordenação de alta afinidade que ocorre entre o metal carregado positivamente e determinados resíduos da papaína carregados negativamente. Essa interação eletrostática é capaz de alterar a distribuição de cargas de enzima e modificar sua conformação, levando ao aumento de sua atividade.

Embora a papaína seja uma enzima proteolítica muito utilizada na terapêutica, ela é pouca estudada por métodos *in vitro*, exatamente devido ao seu próprio mecanismo de ação que age descolando as células que necessitam crescer aderidas, sendo utilizada inclusive como substituinte da tripsina principalmente em cultivo de células neuronais (NIEDRINGHAUS *et al.*, 2015).

A papaína quando empregadas em concentrações acima dos valores de IC₅₀, pode exercer uma ação proteolítica pronunciada sobre células aderentes avaliadas, pois a papaína pode agir sobre determinados resíduos das proteínas de adesão celular fazendo com que essas proteínas sejam desestabilizadas e isso pode promover a ruptura da interação entre as células. Além disso, é sugerido que a papaína possa ter uma maior afinidade com cálcio presente nas proteínas de adesão dependentes desse metal e atuar como um provável agente quelante desse metal, o que pode colaborar com a perda de função dessas proteínas também.

As células desaderidas pela ação da papaína podem entrar em *anoikis*, pois essas células somente são capazes de exercerem seu metabolismo quando aderidas interagindo entre si e com a matriz extracelular (FRISCH; SCREATON, 2001).

É possível observar que a linhagem de células provenientes de roedores foi menos sensível à ação da papaína livre e da formulação de papaína complexada com β -ciclodextrina quando comparadas à linhagem de células de hepatocarcinoma humano, o que pode ser um indicativo da necessidade da realização de ensaios *in vitro* preliminares utilizando células humanas ao invés da utilização de células de outras espécies, na tentativa de ilustrar condições semelhantes de metabolismo quando o interesse principal é a administração por via oral de fármacos para uso humano.

Geralmente, as células tumorais são protegidas com um revestimento composto por fibrina e albumina que, diferentemente da fibrina pura, é resistente à degradação fibrinolítica. Além disso, esse revestimento confere aumento na capacidade de disseminação do tumor e proteção à ação de células do sistema imunológico, dificultando sua localização e eliminação por diferentes células de defesa (ZHENG *et al.*, 2009).

AKILA; SUSHAMA; KUMARESAN (2014), avaliaram a citotoxicidade de 8 diferentes concentrações de papaína, variando entre 7,8 a 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, o que corresponde a, aproximadamente, 0,3 e 42,8 μM , respectivamente, frente às células Hep G2 por 24 horas. A IC_{50} foi de 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ou, aproximadamente, 5,4 μM .

É sugerido que a morte celular observada seja devido à intensa capacidade proteolítica da papaína que poderia ser eficaz frente ao revestimento fibroso das células tumorais o que poderia corroborar a baixa viabilidade celular das células Hep G2 expostas a concentrações mais elevadas das amostras contendo papaína.

Embora ainda existam poucos estudos a respeito da eficácia terapêutica da papaína complexada com ciclodextrinas, a complexação da enzima para administração oral poderia proporcionar o aumento da estabilidade da enzima ao longo do trato gastrointestinal além de favorecer a liberação colônica e direcionar a atuação da enzima para o tratamento específico de patologias intestinais.

CHANDRAN *et al.* (2016) desenvolveram nanopartículas lipídicas sólidas contendo papaína e avaliaram sua atividade antitumoral utilizando cinco concentrações diferentes variando entre 5 e 80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ou 0,2 e 3,4 μM , respectivamente, frente à linhagem de células tumorais HT-29, provenientes de adenocarcinoma de cólon humano. Os resultados encontrados mostram que nas maiores concentrações, a papaína presente nas nanopartículas apresentou uma maior atividade citotóxica do que isolada devido ao aumento de sua estabilidade enzimática quando incorporada nessas nanopartículas. Esses dados foram considerados potencialmente promissores e esse sistema de liberação poderia ser utilizado para o tratamento de patologias colorretais.

A presente avaliação da citotoxicidade desses compostos foi realizada empregando-se somente uma monocamada de células aderentes, o que pode ter colaborado com a citotoxicidade pronunciada da enzima em concentrações mais elevadas, pois a papaína pode ter clivado pontualmente determinadas proteínas envolvidas na adesão celular.

Embora sejam muito utilizadas, as culturas celulares convencionais em 2D mimetizam de forma limitada as condições fisiológicas encontradas no organismo *in vivo*. Segundo SOUZA *et al.* (2010), as células do organismo *in vivo* estão arranjadas de forma tridimensional complexa em condições específicas que possibilitam a interação célula-célula e célula-matriz extracelular e não somente aderidas à uma simples superfície rígida.

A cultura de células em 3D tem sido empregada como uma ferramenta importante que proporciona de forma mais fisiológica a interação de populações celulares heterogêneas entre si, fornecendo um microambiente complexo mais semelhante ao encontrado no organismo *in vivo* e vem sendo utilizada para avaliação da toxicidade e dos mecanismos de ação de

fármacos de forma significativa durante o desenvolvimento de medicamentos (ZANONI *et al.*, 2016).

Acredita-se que modelos *in vitro* que empregam culturas celulares tridimensionais possam ser utilizados na tentativa de minimizar o efeito pronunciada da papaína em desaderir uma simples camada de células para a avaliação de seu comportamento citotóxico de forma mais eficiente (RAVI *et al.*, 2014).

Se por um lado a papaína possa ser aparentemente citotóxica sobre células aderentes devido a sua característica proteolítica, por outro lado, as ciclodextrinas isoladas não possuem essa propriedade e seu perfil de segurança parece estar mais relacionado com a via de administração.

Segundo PATEL; SHAH; MAHESHWARI (2016), a β -ciclodextrina é bem tolerada para uso oral, entretanto, quando administrada por via parenteral, pode recrystalizar e se depositar no rim, levando à nefrotoxicidade. Além disso, MOTOYAMA *et al.* (2009) ainda afirma que essa ciclodextrina em concentrações maiores que 3 mM pode interagir com constituintes como colesterol e fosfolípidos da membrana celular e levar à hemólise das células sanguíneas.

Embora as ciclodextrinas naturais possam levar ao aumento da toxicidade, GOULD; SCOTT (2005) afirma que as ciclodextrinas modificadas mais hidrofílicas, destacando-se a 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina, são consideradas mais seguras para administração oral e parenteral. De acordo com IRIE; UEKAMA (1997), estudos clínicos demonstraram que doses orais diárias de 4 a 8 g de HP- β -CD durante 2 semanas são bem toleradas, sendo o principal efeito adverso a diarreia devido à retenção osmótica no intestino grosso.

A segurança da utilização de ciclodextrinas para complexação com fármacos para administração por via oral é corroborado pelo fato de que as ciclodextrinas somente são metabolizadas por organismos procariotos presentes na microbiota do intestino grosso, originando açúcares simples, como maltose e glicose que podem ser absorvidas ou eliminadas de forma intacta nas fezes (RAMA *et al.*, 2005).

Os complexos de inclusão com ciclodextrinas proporcionam muitos benefícios para biomoléculas, como é o caso da papaína, pois podem aumentar a solubilidade dessas macromoléculas, prolongar sua estabilidade ao longo do trato gastrointestinal, promover o aumento da difusão de fármacos através do epitélio gastrointestinal melhorando, portanto, sua biodisponibilidade e eficácia terapêutica (LOFTSSON; DUCHÊNE, 2007; UEKAMA; HIRAYAMA; IRIE, 1998; ZHANG; MA, 2013).

Nesse trabalho, as ciclodextrinas nas concentrações empregadas não foram capazes de levar à efeitos citotóxicos sobre as células avaliadas.

Sendo assim, a utilização de métodos *in vitro* pode proporcionar a possibilidade de uma melhor compreensão do mecanismo de ação de diversas substâncias, refletindo de

forma mais adequada os processos metabólicos que ocorrem *in vivo*, além de serem considerados uma alternativa viável ao uso de animais para ensaios iniciais de triagens de candidatos a fármacos durante avaliação de toxicidade, levando ao desenvolvimento de medicamentos mais específicos em consonância com a política regulatória bioética mundial de minimizar o uso de animais na pesquisa biomédica (CAVAGNARO; LIMA, 2015).

4.3 Ensaio de fototoxicidade

Após a realização dos ensaios de citotoxicidade e determinação dos valores de IC₅₀, foram realizados os ensaios de fototoxicidade empregando-se a linhagem de células BALB/c 3T3 conforme preconizado pela OECD 432 (2004) (Figura 12).

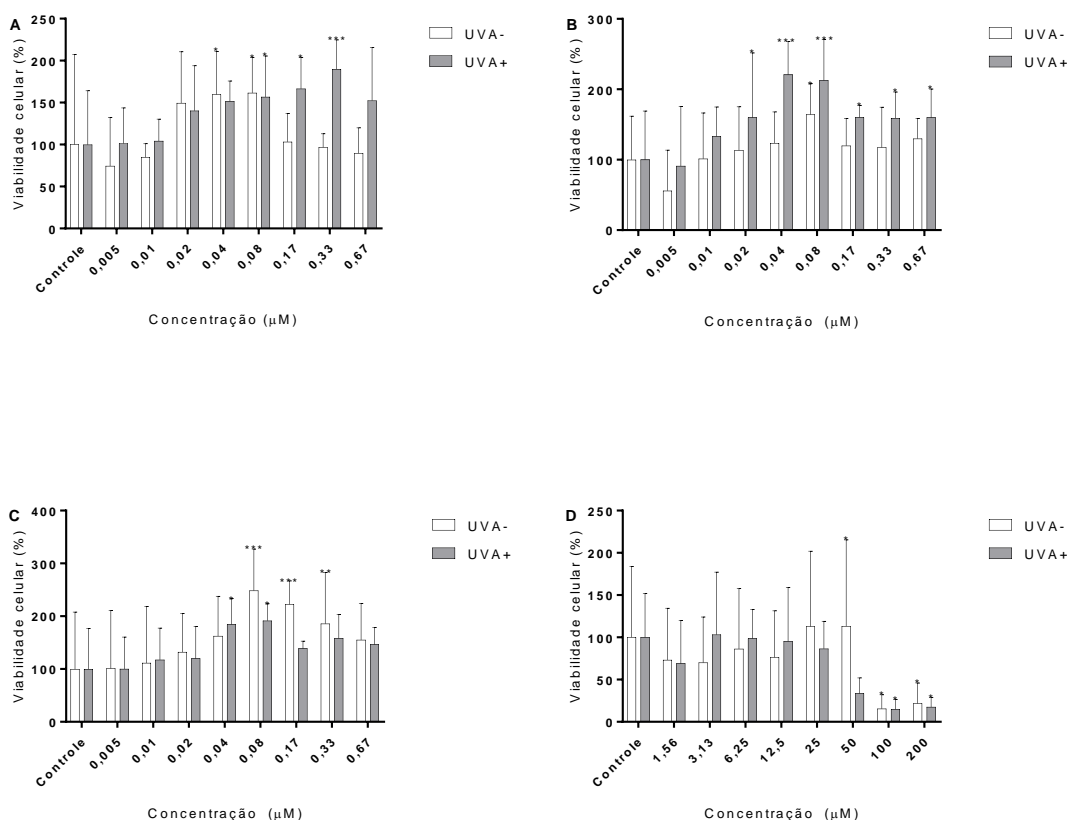


Figura 12. Fototoxicidade da papaína livre e complexada com β-ciclodextrina e 2-hidroxiopropil-β-ciclodextrina. **A.** papaína livre; **B.** papaína complexada com β-ciclodextrina; **C.** papaína complexada com 2-hidroxiopropil-β-ciclodextrina; **D.** norfloxacin. Os dados representam média ± desvio padrão de dois ensaios independentes (n = 12) * p < 0,05, ** p = 0,01 e ***p < 0,0001 comparado ao controle positivo seguido de análise *One-way* ANOVA e teste de Bonferroni.

À exceção do norfloxacino, tanto as amostras de papaína livre quanto as amostras de papaína complexada com ciclodextrinas expostas à radiação UVA (UVA+) e não expostas à radiação UVA (UVA-) apresentaram viabilidades celulares acima de 80%, ou seja, não apresentaram comportamento citotóxico, comparando-as com os controles de células.

Ensaio realizado anteriormente utilizando-se elevadas concentrações de papaína, mostraram elevada citotoxicidade das amostras. Devido a isso, optou-se por empregar concentrações iniciais muito baixas de papaína a fim de eliminar seu caráter citotóxico. Uma vez que a toxicidade gerada parece estar mais relacionada ao impedimento da adesão e viabilidade celular dose-dependente (GRABOVAC *et al.*, 2007).

De acordo com VARCA *et al.* (2007) e LOPES *et al.* (2008b), as amostras contendo papaína não apresentam comportamento citotóxico em baixas concentrações, o que mostra a segurança da utilização da papaína nas formulações (MOHR; DESSER, 2013; SILVA *et al.*, 2010) e de ciclodextrinas (COSMA *et al.*, 2008).

Tabela 3. Resultados de PIF obtidos dos ensaios de fototoxicidade.

Amostra	PIF			Conclusão
	Ensaio 1	Ensaio 2	Média ± DP	
PPN	1	1	1	Não fototóxico
PPN-β-CD	1	1	1	Não fototóxico
PPN-HP-β-CD	1	1	1	Não fototóxico
NOR	4,5	2,5	3,4 ± 1,3	Provavelmente fototóxico

DP: desvio padrão; PPN: papaína livre; PPN-β-CD: papaína complexada com β-ciclodextrina; PPN-HP-β-CD: papaína complexada com 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina; NOR: norfloxacino.

Os resultados mostram que a papaína livre e complexada com as diferentes ciclodextrinas não apresentou comportamento fototóxico tendo em vista que o valor de PIF foi igual a 1, ou seja, as amostras contendo papaína encontram-se dentro da faixa de aceitação para serem consideradas fotosseguras. O norfloxacino apresentou fototoxicidade, pois o valor de PIF foi maior que 1, ou seja, ele pode ser considerado com um bom controle positivo para a realização do ensaio de fototoxicidade.

Diversos estudos evidenciam a segurança da utilização de ativos vegetais com aplicações cosméticas (ESTEVES-PEDRO *et al.*, 2011; KAWAKAMI; GASPAR, 2015; MOREIRA *et al.*, 2017), corroborando a extrema importância da comprovação da baixa toxicidade de biomoléculas durante a pesquisa e desenvolvimento de formulações cosméticas.

Além da utilização da papaína ser considerada segura, PARTYKA; AU; EVANS (2001) afirma que as ciclodextrinas também podem inibir a fototoxicidade de diversas substâncias devido à complexação com grupamentos químicos considerados fotorreativos, diminuindo sua exposição à pele, minimizando possíveis danos nocivos e deletérios às estruturas celulares.

Portanto, a papaína complexada com ciclodextrinas poderia ser utilizada em formulações de forma segura e eficaz como agente anti-inflamatório e promotora de permeação de diversos ativos.

4.4 Ensaio de genotoxicidade

O ensaio de genotoxicidade é realizado com o objetivo de identificar compostos químicos que podem causar alterações genéticas em células durante a triagem no desenvolvimento de novos fármacos. Dentre a variedade de ensaios de genotoxicidade, o teste do micronúcleo *in vitro* é relativamente simples e robusto e pode identificar se esses compostos são capazes de induzir quebras, perdas ou anormalidades cromossômicas que são expressas após o processo de divisão celular (FENECH *et al.*, 2011).

A realização do teste de micronúcleo *in vitro* utilizando células aderentes fornece uma ferramenta confiável e importante para detecção de fragmentos de DNA no citoplasma de células em intérfase, após a exposição das células à agentes clastogênicos (agentes que induzem rupturas cromossômicas) ou aneugênicos (agentes que alteram o número normal de cromossomos) potencialmente carcinogênicos (KIRSCH-VOLDERS *et al.*, 2003).

A formação de micronúcleos é resultado de alterações celulares irreversíveis e a presença desses fragmentos no citoplasma é um importante indicativo de alterações no material genético das células. Ou seja, um resultado positivo nesse ensaio indica que a substância induz a danos no material genético celular e isso pode contribuir com o aumento do risco de desenvolvimento de câncer (KIRSCH-VOLDERS *et al.*, 2011).

Para a avaliação de possíveis danos genotóxicos, a investigação da formação de micronúcleos é um método empregado para a realização de testes que avaliam a segurança toxicológica de forma preditiva (HEDDLE *et al.*, 2011). É importante ressaltar que a OECDE 487 (2016) preconiza que a contagem das células e dos micronúcleos seja realizada por meio da análise de lâminas. Entretanto, existe uma crescente necessidade pela automatização desse ensaio, principalmente na fase referente à contagem das células.

Atualmente, diversos grupos de pesquisa empregam a miniaturização do ensaio, com a utilização de quantidades menores de reagentes e materiais (DONG; SUN; ZHENG, 2016) e técnicas analíticas automatizadas, tais como, a citometria de fluxo para ensaios de triagem com alto rendimento (BRYCE *et al.*, 2011).

O citômetro de fluxo é um equipamento que identifica múltiplas características físicas tais como tamanho, granulidade e a intensidade de fluorescência em partículas individuais e seu princípio consiste na detecção da fluorescência de partículas marcadas com anticorpos que se ligam a superfície celular, intracelular ou nuclear (HAWLEY; HAWLEY, 2004).

De acordo com LENZI; COCCHI; HRELIA (2017), o uso da citometria de fluxo para a realização desse ensaio proporciona a minimização dos fatores de confusão e perdas de

células além da otimização de tempo dedicado à contagem das diferentes populações celulares para a realização desse ensaio *in vitro*, ou seja, essa técnica é considerada uma grande facilitadora durante a contagem das células e dos micronúcleos, devido à rapidez, robustez e precisão de análise quando comparada ao método clássico de leitura das lâminas ao microscópio óptico.

Segundo BRYCE *et al.* (2013), a técnica consiste basicamente em lisar as células utilizando-se um detergente não iônico para que a remoção das membranas citoplasmáticas permita corar o material genético para discriminar os núcleos e micronúcleos por meio da intensidade de fluorescência associada ao DNA. Para isso, são utilizados o corante EMA, para diferenciar o material genético proveniente de células saudáveis e excluir células apoptóticas necróticas que apresentam membranas celulares comprometidas, o corante SYTOX, para corar o material genético de células saudáveis e também são utilizadas microesferas de látex fluorescentes denominadas *beads* como uma medida para quantificação relativa do número de células.

Uma importante vantagem da utilização deste método é a sua habilidade de mensurar de forma apurada e objetiva a frequência de defeitos no DNA. Além disso, o micronúcleo aparece após o dano, antes mesmo de qualquer alteração pré-maligna clínica ou até mesmo histológica ou seja, detecta danos irreversíveis o que não ocorre no teste do cometa (HINTZSCHE;MONTAG; STOPPER, 2018).

A escolha das concentrações a serem testadas para a avaliação da mutagenicidade deve considerar testes preliminares de toxicidade celular a fim de eleger a maior concentração que não seja tóxica para as células, ou seja, que garanta viabilidade celular. Para a realização desse ensaio, foram utilizadas as concentrações abaixo dos valores de IC₅₀ obtidos por meio dos ensaios de citotoxicidade realizados anteriormente.

Esse teste pode ser executado praticamente em qualquer população de células que estejam constantemente em divisão e para a realização desse ensaio. Para esse ensaio, foram utilizadas as linhagens celulares CHO-K1 e Hep G2, ambas preconizadas pela OECD 487 (2016).

De acordo com a OECD 487 (2016), as células CHO-K1 é uma das linhagens preconizadas para a realização desses ensaios e muitos trabalhos utilizam essas células com objetivo de avaliar o perfil de toxicidade genética de diversas substâncias durante os ensaios não clínicos, pois essas células apresentam facilidade no cultivo e rápida taxa de duplicação, embora sejam provenientes de mamíferos roedores (AARDEMA *et al.*, 2006; CHIEN *et al.*, 2015; ESTEVES-PEDRO *et al.*, 2011; JIANG *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2014; TILMANT *et al.*, 2013).

Segundo diversos autores, as células Hep G2 também são de fácil cultivo e podem manter algumas das funções celulares semelhantes aos hepatócitos normais, como a

expressão de receptores específicos de superfície celular, síntese e secreção de proteínas plasmáticas e, além disso, mantém a atividade de certas enzimas de fase 1 (reações de oxidação) e fase 2 (reações de conjugação) do metabolismo relacionado à ativação e desintoxicação de moléculas potencialmente genotóxicas (DEHN *et al.*, 2004; DONATO *et al.*, 2008; HOSHINA *et al.*, 2013; SAHU *et al.*, 2014; UHL; HELMA; KNASMÜLLER, 2000).

Desse modo, o fato das células Hep G2 apresentarem características semelhantes ao fígado humano pode oferecer um resultado mais preditivo ao que se refere ao metabolismo de primeira passagem de fármacos administrados por via oral e seu potencial mutagênico após metabolização hepática (DONATO; TOLOSA; GÓMEZ-LECHÓN, 2015).

Com relação à frequência de micronúcleos, é possível observar os efeitos da papaína e seus complexos sobre as linhagens de células CHO-K1 (Figura 13) e Hep G2 (Figura 14) após o período de incubação de 4 horas.

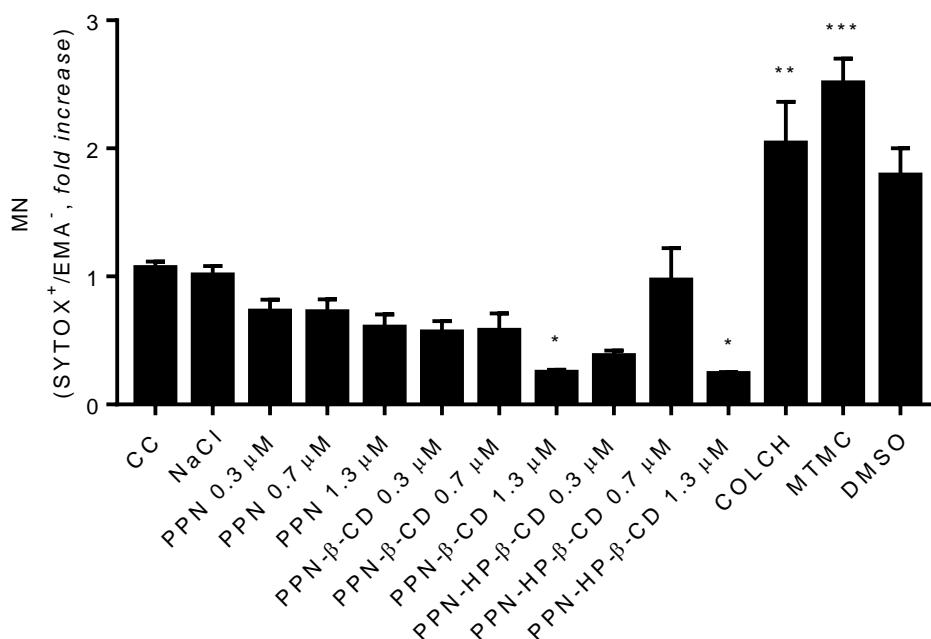


Figura 13. Quantidade relativa de micronúcleos (MN) formados após a linhagem CHO-K1 ser exposta às amostras de papaína livre (PPN), complexada com β-ciclodextrina (PPN-β-CD) e complexada com 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (PPN-HP-β-CD) nas concentrações de 0,3, 0,7 e 1,3 μM por 4 horas. Controle de Células (CC), Cloreto de sódio (NaCl), Colchicina (COLCH), Mitomicina C (MTMC), Dimetilsulfóxido (DMSO) foram utilizados como controles. Os dados representam a média de triplicatas ± desvio padrão de dois ensaios independentes (n = 6) *p < 0,05; **p = 0,0003; ***p < 0,0001 comparado com controle de células seguido de análise *One-way* ANOVA e teste de Bonferroni.

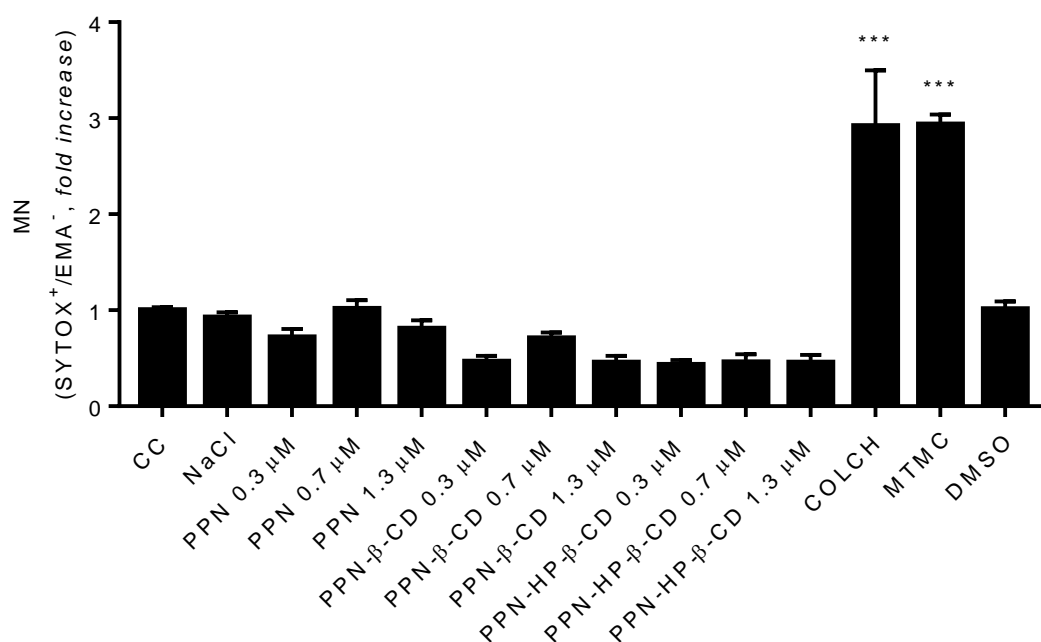


Figura 14. Quantidade relativa de micronúcleos (MN) formados após a linhagem Hep G2 ser exposta às amostras de papaína livre (PPN), complexada com β -ciclodextrina (PPN- β -CD) e complexada com 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (PPN-HP- β -CD) nas concentrações de 0,3, 0,7 e 1,3 μ M por 4 horas. Controle de Células (CC), Cloreto de sódio (NaCl), Colchicina (COLCH), Mitomicina C (MTMC), Dimetilsulfóxido (DMSO) foram utilizados como controles. Os dados representam a média de triplicatas \pm desvio padrão de dois ensaios independentes (n = 6) ***p < 0,0001 comparado com controle de células seguido de análise *One-way* ANOVA e teste de Bonferroni.

Na Figura 15, é possível observar a presença dos núcleos, das *beads* e das células inviáveis.

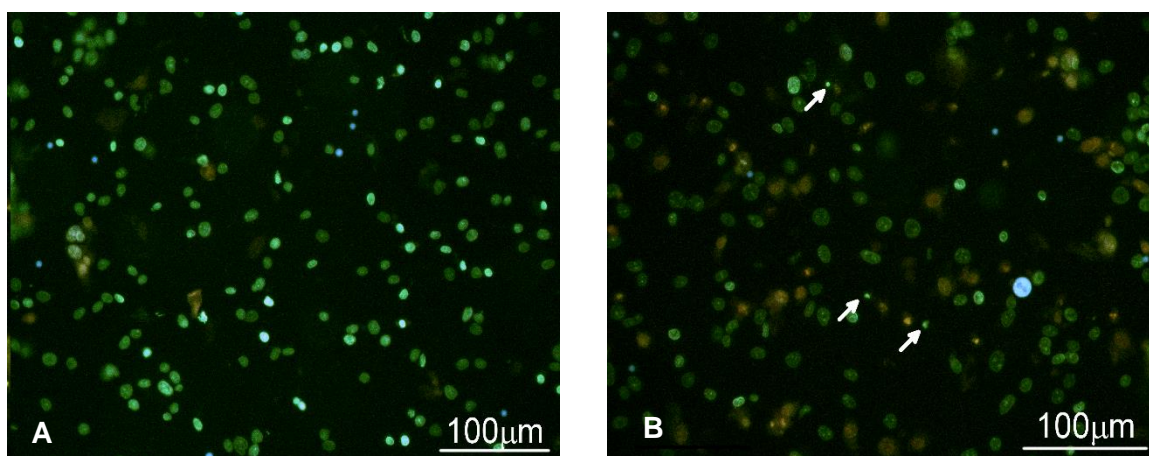


Figura 15. Microscopia de fluorescência das células Hep G2. É possível observar núcleos (verde), *beads* (azul) e células inviáveis (vermelho). **A.** Controle de Células. **B.** Células tratadas com Mitomicina C por 4 horas. A seta indica a presença de micronúcleos.

Com relação à frequência de micronúcleos nas células CHO-K1, é possível visualizar que houve uma diminuição significativa do número de eventos das células expostas à papaína complexada com β -ciclodextrina e complexada com 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina, ambas na concentração de 1,3 μ M comparado ao número de eventos do controle de células não tratadas. Isso pode ser explicado tendo em vista o caráter proteolítico da enzima, que pode ter sido capaz de influenciar na adesão dessas células durante a realização desse ensaio mesmo em concentrações abaixo da IC₅₀.

A quantidade de micronúcleos formados quando as células foram expostas aos controles aneugênico (Colchicina) e clastogênico (Mitomicina C) foi muito significativa em relação ao controle de células, demonstrando que a utilização desses agentes foi eficaz para a realização desses ensaios. Além disso, não foram verificados danos genotóxicos consideráveis sobre as células CHO-K1 empregando-se as determinadas concentrações de papaína livre e complexadas.

Com relação à frequência de micronúcleos nas células Hep G2, não foram verificados danos genotóxicos consideráveis sobre essas empregando-se as concentrações de papaína livre e complexadas avaliadas. Além disso, a quantidade de micronúcleos formados quando as células foram expostas aos controles aneugênico (Colchicina) e clastogênico (Mitomicina C) foi muito significativa em relação ao controle de células não tratadas, demonstrando que a utilização desses agentes também foi eficaz para a realização desses ensaios. Esses resultados sugerem de forma preditiva que tanto a papaína livre quanto complexada com as

diferentes ciclodextrinas não se torna mutagênica após exposição ao metabolismo de células de origem hepática humana.

A ausência de eventos genotóxicos da papaína também foi demonstrada por SILVA *et al.* (2010), que comprovou a ausência de mutagenicidade da papaína em concentrações entre 5 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ou 0,2 e 21 μM , respectivamente, utilizando DNA plasmidial de organismos procariontes empregando a técnica molecular de eletroforese em gel de agarose.

Infelizmente, na literatura pesquisada, ainda não existem muitos estudos referentes à avaliação da genotoxicidade da papaína complexada com diferentes ciclodextrinas, o que evidencia a importância desse trabalho em fornecer informações a cerca da segurança desses compostos.

A frequência de micronúcleos das células expostas aos controles positivos foi relativamente alta comparada às demais amostras, o que mostra uma boa sensibilidade do ensaio e, portanto, houve a configuração de bons controles positivos.

Embora a utilização de ambas as linhagens celulares mostrou-se adequada para a predição da ausência de genotoxicidade dos compostos contendo papaína, há indícios que o emprego de células de origem humana para avaliação da genosseguurança de formulações para administração por via oral para humanos apresente maior confiabilidade. LIAO *et al.* (2012), comparou o emprego da linhagem de células provenientes de roedores - CHO-K1 e V79 (fibroblastos de pulmão de camundongos) e linfócitos de sangue periférico humano para a predição da formação de micronúcleos e outras alterações genéticas quando essas células foram expostas à diferentes concentrações de mitomicina C. Eles concluíram que as células de origem humana apresentaram maior seletividade nos ensaios citogenéticos, destacando-se o ensaio de micronúcleos *in vitro*.

O critério de interpretação preconizado pela OECD 487 (2016) considera que uma substância é claramente não genotóxica quando nenhuma das concentrações testadas apresenta aumento estatisticamente significativo quando comparada com o controle negativo. DIAZ *et al.* (2007), definiu o resultado de genotoxicidade positivo quando há um aumento estatisticamente significativo na frequência de células micronucleadas em comparação aos valores de controle correspondentes e um aumento relativo ≥ 3 vezes na porcentagem de células micronucleadas em comparação com os valores de controle. Desse modo, é possível afirmar que as amostras de papaína livre e complexada com β -ciclodextrina e com 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina não foram capazes de promover alterações genéticas significativas e podem ser consideradas não genotóxicas nas concentrações empregadas.

5. Conclusão

Os resultados indicam que as amostras de papaína livre e complexada com β -ciclodextrina e 2-hidroxi-propil- β -ciclodextrina não apresentaram citotoxicidade sobre as células BALB/c 3T3 clone A31, CHO-K1, HuTu 80, Caco-2, HT-29, HT29-MTX, Hep G2, Raji e fibroblastos humanos nas menores concentrações testadas e também não foram consideradas fototóxicas sobre as células BALB/c 3T3 e nem genotóxicas sobre as células CHO-K1 e Hep G2, o que demonstra seu potencial de segurança para o desenvolvimento de medicamentos para administração oral para tratamento de patologias intestinais.

6. Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer a Profa. Dra. Renata Rosito Tonelli, do Departamento de Microbiologia Imunobiologia e Parasitologia da Universidade Federal de São Paulo por ter cedido gentilmente as linhagens de células HuTu 80 e HT-29. Ao Prof. Dr. Breno Pannia Espósito, do Instituto de Química da Universidade de São Paulo por ter cedido gentilmente a linhagem de células Hep G2. Ao Dr. Cesar Isaac, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo por ter cedido gentilmente os fibroblastos humanos. Ao Dr. Daniel Perez Vieira e à Luma Ramirez de Carvalho, do Laboratório de Radiobiologia do Centro de Biotecnologia do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares pelo suporte fornecido. A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de bolsa (processo FAPESP n. 2015/19212-3) e pelo financiamento do projeto (processo FAPESP n. 2015/19213-0).

7. Referências

- ABRAHAM, C.; CHO, J.H. Inflammatory bowel disease. **N. Engl. J. Med.**, v.361, n.21, p.2066-78, 2009.
- AARDEMA, M.J. *et al.* SFTG international collaborative study on *in vitro* micronucleus test III. Using CHO cells. **Mutat. Res.**, v.607, n.1, p.61-7, 2006.
- ADAN, A.; KIRAZ, Y.; BARAN, Y. Cell proliferation and cytotoxicity assays. **Curr. Pharm. Biotechnol.**, v.17, n.14, p.1213-21, 2016.
- AKILA, M.; SUSHAMA, M.; KUMARESAN, R. Study on *in vitro* cytotoxicity of papain against liver cancer cell line HepG2. **Int. J. Pharm. Pharm. Sci.**, v.6, n.9, p.160-1, 2014.
- BABU, M. **Silk**: processing, properties and applications. 1st ed. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2013.
- BARATA, P. *et al.* Veiculação de fármacos para o cólon. **Rev. Facul. Ciênc. Saúde**, v.4, p.134-43, 2007.
- BEHNKE, J.M. *et al.* Developing novel anthelmintics from plant cysteine proteinases. **Parasites & Vectors**, v.1, n.29, p.1-18, 2008.

BORENFREUND, E.; PUERNER, J.A. Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. **Toxicol. Lett.**, v.24, p.119-124, 1985.

BREWSTER, M.E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.59, n.7, p.645-66, 2007.

BRYCE, S.M. *et al.* Flow cytometric 96-well microplate-based *in vitro* micronucleus assay with human TK6 cells: protocol optimization and transferability assessment. **Environ. Mol. Mutagen.**, v.54, n.3, p.180-94, 2013.

BRYCE, S.M. *et al.* Miniaturized flow cytometry-based CHO-K1 micronucleus assay discriminates aneugenic and clastogenic modes of action. **Environ. Mol. Mutagen.**, v.52, n.4, p.280-6, 2011.

CAHYANINGRUM, S.E. *et al.* Preparation and properties of papain immobilized onto metal ions cross-linked chitosan beads. **Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.**, v.4, n.4, p.120-6, 2013.

CAVAGNARO, J.; LIMA, B.S. Regulatory acceptance of animal models of disease to support clinical trials of medicines and advanced therapy medicinal products. **Eur. J. Pharmacol.**, v.759, p.51-62, 2015.

CHANDRAN, S.P. *et al.* Papain loaded solid lipid nanoparticles for colorectal cancer therapy. **Curr. Cancer Ther. Rev.**, v.14, p.75-87, 2018.

CHIEN, M.Y. *et al.* Gastroprotective potential against indomethacin and safety assessment of the homology of medicine and food formula cuttlebone complex. **Food Funct.**, v.6, n.8, p.2803-12, 2015.

COSMA, P. *et al.* Phototoxicity and cytotoxicity of chlorophyll a/cyclodextrins complexes on Jurkat cells. **Bioelectrochemistry**, v.74, p.58-61, 2008.

DEHN, P.F. *et al.* Characterization of the human hepatocellular carcinoma (hepg2) cell line as an *in vitro* model for cadmium toxicity studies. **In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.**, v.40, n.5-6, p.172-82, 2004.

DIAZ, D. *et al.* Evaluation of an automated *in vitro* micronucleus assay in CHO-K1 cells. **Mutat. Res.**, v.630, n.1-2, p.1-13, 2007.

DONATO, M.T. *et al.* Cell Lines: a tool for *in vitro* drug metabolism studies. **Curr. Drug Metab.**, v.9, p.1-11, 2008.

DONATO, M.T.; TOLOSA, L.; GÓMEZ-LECHÓN, M.J. Culture and functional characterization of human hepatoma HepG2 cells. **Methods Mol. Biol.**, v.1250, p.77-93, 2015.

DONG, H.; SUN, H.; ZHENG, J. A microchip for integrated single-cell genotoxicity assay. **Talanta**, v.161, p.804-11, 2016.

ESTEVEZ-PEDRO, N.M. *et al.* Implementation of the three Rs in the human hazard assessment of brazilian medicinal plants: an evaluation of the cytotoxic and genotoxic potential of *Dipteryx alata* Vogel. **ATLA**, v.39, p.189-196, 2011.

FENECH, M. *et al.* Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, v.26, n.1, p.125-32, 2011.

FERRAZ, C.C. *et al.* Validation of *in vitro* analytical method to measure papain activity in pharmaceutical formulations. **Int. J. Pharm. Pharm. Sci.**, v.6, n.2, 658-61, 2014.

FLINDT, M.L. Allergy to alpha-amylase and papain. **Lancet**, v.1, n.8131, p.1407-8, 1979.

FRISCH, S.M.; SCREATON, R.A. Anoikis mechanisms. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v.13, n.5, p.555-62, 2001.

GALLUZZI, L. *et al.* Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. **Cell Death Differ.**, v.14, n.7, p.1237-43, 2007.

GOULD, S.; SCOTT, R.C. 2-Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HP-beta-CD): a toxicology review. **Food Chem.Toxicol.**, v.43, n.10. p.1451-9, 2005.

GRABOVAC, V. *et al.* Papain: an effective permeation enhancer for orally administered low molecular weight heparin. **Pharm. Res.**, v.24, n.5, p.1001-6, 2007.

GROOTHUIS, F.A. *et al.* Dose metric considerations in *in vitro* assays to improve quantitative *in vitro-in vivo* dose extrapolations. **Toxicology**, v.332, p.30-40, 2015.

GUMBINER, B.M. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. **Cell**, v.84, p.345-57, 1996.

HAWLEY, T. S.; HAWLEY, R. G. Flow cytometry protocols. 2. ed. p. 434. Totowa, New Jersey: **Humana Press Inc.**, 2004.

HEDDLE, J.A. *et al.* Reflections on the development of micronucleus assays. **Mutagenesis**, v.26, n.1, p.3-10. 2011.

HINTZSCHE, H.; MONTAG, G.; STOPPER, H. Induction of micronuclei by four cytostatic compounds in human hematopoietic stem cells and human lymphoblastoid TK6 cells. **Sci. Rep.**, v.8, n.3371, p.1-11, 2018.

HOMAEI, A. Enhanced activity and stability of papain immobilized on CNBr-activated sepharose. **Int. J. Biol. Macromol.**, v.75, p.373-7, 2015.

HOSHINA, M. M. *et al.* Cytotoxic, genotoxic/antigenotoxic and mutagenic/antimutagenic effects of the venom of the wasp *Polybia paulista*. **Toxicon**, v.72, p.64-70, 2013.

IRIE, T.; UEKAMA, K. Pharmaceutical applications of cyclodextrins III. Toxicological issues and safety evaluation. **J. Pharm.Sci.**, v.86, n.2, p.147-62, 1997.

JIANG, X. *et al.* Multi-platform genotoxicity analysis of silver nanoparticles in the model cell line CHO-K1. **Toxicol. Lett.**, v.222, n.1, p.55-63, 2013.

KAMPHUIS, I.G. *et al.* Structure of papain refined at 1.65 angstrom resolution. **J. Mol. Biol.**, v.179, p.233-256, 1984.

KAUL, P.; SATHISH, H.A.; PRAKASH, V. Effect of metal ions on structure and activity of papain from *Carica papaya*. **Nahrung**, v.46, n.1, p.2-6, 2002.

KAWAKAMI, C.M.; GASPAR, L.R. Mangiferin and naringenin affect the photostability and phototoxicity of sunscreens containing avobenzone. **J. Photochem. Photobiol. B**, v.151, p.239-47, 2015.

KIRSCH-VOLDERS, M. *et al.* Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. **Mutat. Res.**, v.540, n.2, p.153-63, 2003.

KIRSCH-VOLDERS, M. *et al.* The *in vitro* MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. **Arch. Toxicol.**, v.85, n.8 p.873-99, 2011.

LEE, Y.S. *et al.* Phototoxicity evaluation of pharmaceutical substances with a reactive oxygen species assay using Ultraviolet A. **Toxicol. Res.**, v.33, n.1, p.43-8, 2017.

LENZI, M.; COCCHI, V.; HRELIA, P. Flow cytometry vs optical microscopy in the evaluation of the genotoxic potential of xenobiotic compounds. **Cytometry B Clin. Cytom.**, 2017.

LIAO, P.H. *et al.* Evaluation of differential representative values between Chinese hamster cells and human lymphocytes in mitomycin C-induced cytogenetic assays and caspase-3 activity. **Toxicol. Ind. Health**, v.28, n.2, p.174-80, 2012.

LOFTSSON, T.; DUCHÊNE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **Int. J. Pharm.**, v.329, p.1-11, 2007.

LOPES, P.S. *et al.* Evaluation of *in vitro* percutaneous enhancement effect of papain and pequi oil on diclofenac sodium permeation through human skin. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 44, n. 2, p. 225-231, 2008a.

LOPES, P.S. *et al.* *In vitro* safety assessment of papain on human skin: a qualitative Light and Transmission Electron Microscopy (TEM) study. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v.44, n.1, p.151-6, 2008b.

LUNDQUIST, P.; ARTURSSON, P. Oral absorption of peptides and nanoparticles across the human intestine: Opportunities, limitations and studies in human tissues. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.106, n. Pt B, p.256-76, 2016.

MANDELBAUM, S.H.; DI SANTIS, E.P.; MANDELBAUM, M.H.S. Cicatrization: current concepts and auxiliary resources - Part II. **An. Bras. Dermatol.**, v.78, n.5, p.525-42, 2003.

MANOSROI, A. *et al.* Toxicity reduction and MMP-2 stimulation of papain and bromelain loaded in elastic niosomes. **J. Biomed. Nanotechnol.**, v.8, n.5, p.720-9, 2012.

MATHIJSEN, R.H.; SPARREBOOM, A.; VERWEIJ, J. Determining the optimal dose in the development of anticancer agents. **Nat. Rev. Clin. Oncol.**, v.11, n.5, p.272-81, 2014.

MÉNARD, R. *et al.* A Protein engineering study of the role of aspartate 158 in the catalytic mechanism of papain. **Biochemistry**, v.29, p.6706-13, 1990.

MIZUNO, C.S. Cytotoxicity and genotoxicity of stilbene derivatives in CHO-K1 and Hep G2 cell lines. **Genet. Mol. Biol.**, v.40, n.3, p.656-64, 2017.

MOHR, T.; DESSER, L. Plant proteolytic enzyme papain abrogates angiogenic activation of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) *in vitro*. **BMC Complement. Altern. Med.**, v.13, n.231, p.1-9, 2013.

MONETTA, L. Uso da papaína nos curativos feitos pela enfermagem. **Rev. Bras. Enferm.**, v.40, n.1, p.66-73, 1987.

MOREIRA, L.C. *et al.* *In vitro* safety and efficacy evaluations of a complex botanical mixture of *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae): Prospects for developing a new dermocosmetic product. **Toxicol. In Vitro**, v.45, p.397-408, 2017.

MOSSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Meth.**, v.65, p.55-63, 1983.

MOTOYAMA, K. *et al.* Involvement of lipid rafts of rabbit red blood cells in morphological changes induced by methylated beta-cyclodextrins. **Biol. Pharm. Bull.**, v.32, n.4, p.700-5, 2009.

MOTTA, L.J. *et al.* Efficacy of Papacarie® in reduction of residual bacteria in deciduous teeth: a randomized, controlled clinical trial. **Clinics (São Paulo)**, v.69, n.5, p.319-22, 2014.

MÜLLER, A. *et al.* Comparative study of antitumor effects of bromelain and papain in human cholangiocarcinoma cell lines. **Int. J. Oncol.**, v.48, p.2025-34, 2016.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **J. Nat. Prod.**, v.79, n.3, p.629-61, 2016.

NICOLETTI, C. D. *et al.* Papain hydrogel with polysorbate: critical micelle concentration and thermodynamics stability. **Asian Journal of Pharmaceutical Technology Innovation**, v. 5, p.1-9, 2017.

NIEDRINGHAUS, M. *et al.* Transferable neuronal mini-cultures to accelerate screening in primary and induced pluripotent stem cell-derived neurons. **Sci. Rep.**, v.5, n.8353, p.1-18, 2015.

OCAMPO, I.Z. *et al.* *In vitro* cytotoxic and genotoxic evaluation of peptides used in nuclear medicine (DOTATATE and Ubiquicidin₂₉₋₄₁) in CHO-K1 cells. **Cytotechnology**, v.68, n.6, p.2301-10, 2016.

ONOUE, S. *et al.* Chemical photoallergy: photobiochemical mechanisms, classification, and risk assessments. **J. Dermatol. Sci.**, v.85, p.4-11, 2017.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Guidelines for the testing of chemicals Test No. 432: In vitro 3T3 NRU phototoxicity test**, 2004.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Guideline for testing of chemicals Test No. 487: In vitro mammalian cell micronucleus test**, 2016.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Series on testing and assessment Test No. 129:** guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests, 2010.

PAOLI, P.; GIANNONI, E.; CHIARUGI, P. *Anoikis* molecular pathways and its role in cancer progression. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1833, p.3481-98, 2013.

PARTYKA, M.; AU, B.H.; EVANS, C.H. Cyclodextrins as phototoxicity inhibitors in drug formulations: studies on model systems involving naproxen and β -cyclodextrin. **J. Photochem. Photobiol. A**, v.140, p.67-74, 2001.

PATEL, Z.K.; SHAH, J.S.; MAHESHWARI, D.G. A review of current regulatory mechanism for pharmaceutical excipients in USA. **Int. J. Pharm. Technol.**, v.8, n.1, p.3712-38, 2016.

RAMA, A.C.R. *et al.* Aspectos biofarmacêuticos da formulação de medicamentos para neonatos. Fundamentos da complexação de indometacina com hidroxipropil- β -ciclodextrina para tratamento oral do fechamento do canal arterial. **Rev. Bras. Cien. Farm.**, v.41, n.3, p.281-99, 2005.

RAVI, M. *et al.* 3D cell culture systems: advantages and applications. **J. Cell Physiol.**, v.230, n.1, p.16-26, 2015.

RIBEIRO, A.P.L. *et al.* Efetividade dos géis de papaína a 2% e 4% na cicatrização de úlceras venosas. **Rev. Esc. Enferm. USP**, v.49, n.3, p.395-402, 2015.

ROGENSKI, N.M.B. *et al.* Uso de papaína em infecções de vísceras. **Rev. Bras. Enferm.**, v.48, n.2, p.140-3, 1995.

SAHU, S.C. *et al.* Comparative genotoxicity of nanosilver in human liver HepG2 and colon Caco2 cells evaluated by a flow cytometric *in vitro* micronucleus assay. **J. Appl. Toxicol.**, v.34, n.11, p.1226-34, 2014.

SANKALIA, M.G. *et al.* Physicochemical characterization of papain entrapped in ionotropically cross-linked kappa-carrageenan gel beads for stability improvement using doehlert shell design. **J. Pharm. Sci.**, v.95, n.9, p.1994-2013, 2006.

SAKALOVÁ, A. *et al.* Retrolective cohort study of an additive therapy with an oral enzyme preparation in patients with multiple myeloma. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v.47, p. S28-244, 2001.

SANTOS, G.S. *et al.* Effect of Brazilian propolis (AF-08) on genotoxicity, cytotoxicity and clonogenic death of Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells irradiated with (60)Co gamma-radiation. **Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.**, v.762, p.17-23, 2014.

SHARMA, M.; SHARMA, V.; MAJUMDAR, D.K. Influence of tableting on enzymatic activity of papain along with determination of its percolation threshold with microcrystalline cellulose. **Int. Sch. Res. Notices**, v.2014, p.1-8, 2014.

SHUKOR, Y. *et al.* Development of a heavy metals enzymatic-based assay using papain. **Anal. Chim. Acta**, v.566, n.2, p.283-9, 2006.

SILVA, C.R. *et al.* Genotoxic and cytotoxic safety evaluation of papain (*Carica papaya* L.) using in vitro assays. **J. Biomed. Biotech.**, v.2010, p.1-8, 2010.

SOUZA, G.R. *et al.* Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation. **Nat. Nanotechnol.**, v.5, n.4, p.291-6, 2010.

SOUZA, J.; FREITAS, Z.M.F.; STORPIRTIS, S. Modelos *in vitro* para determinação da absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/absorção. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v.43, n.4, p.515-27, 2007.

SPIELMANN, H. *et al.* The international EU/COLIPA *in vitro* phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial). Part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. **Toxicol. in Vitro**, v.12, p.305-27, 1998.

STREMNITZER, C. *et al.* Papain degrades tight junction proteins of human keratinocytes in vitro and sensitizes C57BL/6 mice via the skin independent of its enzymatic activity or TLR4 activation. **J. Investig. Dermatol.**, v.135, p.1790-1800, 2015.

TELGENHOFF, D. *et al.* Influence of papain urea copper chlorophyllin on wound matrix remodeling. **Wound Repair Regen.**, v.15, n.5, p.727-35, 2007.

TILMANT, K. *et al.* The automated micronucleus assay for early assessment of genotoxicity in drug discovery. **Mutat. Res.**, v.751, n.1, p.1-11, 2013.

UEKAMA, K.; HIRAYAMA, F.; IRIE, T. Cyclodextrin Drug Carrier Systems. **Chem. Rev.**, v.98, n.5, p.2045-76, 1998.

UHL, M.; HELMA, C.; KNASMÜLLER, S. Evaluation of the single cell gel electrophoresis assay with human hepatoma (HepG2) cells. **Mutat. Res.**, v.468, p.213-25, 2000.

VARCA, G.H.C. *et al.* Cyclodextrins: an overview of the complexation of pharmaceutical proteins. **Curr. Protein Pept. Sci.**, v.11, n.4, p.255-63, 2010.

VARCA, G.H.C. *et al.* Thermal characterization and cytotoxicity of complexes formed by papain and cyclodextrin. **J. Biol. Phys.**, v.33, p.463-75, 2007.

ZANONI, M. *et al.* 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. **Sci. Rep.**, v.6, p.1-11, 2016.

ZHANG, J.; MA, P.X. Cyclodextrin-based supramolecular systems for drug delivery: recent progress and future perspective. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.65, n.9, p.1215-33, 2013.

ZHENG, S. *et al.* Platelets and fibrinogen facilitate each other in protecting tumor cells from natural killer cytotoxicity. **Cancer Sci.**, v.100, n.5, p.859-65, 2009.

ZULLI, G. *et al.* Influence of gamma radiation onto polymeric matrix with papain. **Radiat. Phys. Chem.**, v.79, p.286-8, 2010.

Capítulo 2 – Avaliação permeabilidade da
furosemida através da monocamada de células
Caco-2

Resumo

A papaína é uma fitoenzima utilizada na terapêutica para o tratamento de feridas devido a sua atividade proteolítica debridante capaz de estimular a cicatrização. Além disso, essa enzima também pode ser empregada como promotora de permeação de ativos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar *in vitro* a citotoxicidade e a capacidade de promoção da permeabilidade das amostras contendo papaína livre e complexada com β -ciclodextrina e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina em favorecer a permeação da furosemida através do modelo de monocamada de células Caco-2. A viabilidade celular foi avaliada pela conversão mitocondrial do MTT e pela liberação de LDH citosólico empregando-se diferentes concentrações das amostras. A permeabilidade aparente (P_{app}) da furosemida e do metoprolol pode ser calculada após quantificação desses marcadores por HPLC. A integridade da monocamada foi mensurada pela RET (Resistência Elétrica Transepitelial) e também pelo *Lucifer Yellow* (LY). A presença da glicoproteína-P (P-gp) foi avaliada mediante o efluxo da rodamina 123 (ROD123). As amostras contendo papaína apresentaram baixa citotoxicidade e não foram capazes de promover a liberação de LDH, sendo indicativo da manutenção da integridade bioquímica das células. A P_{app} da furosemida foi de $2,8 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$ e de $7,0 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$ na presença de papaína complexada com ciclodextrinas. O metoprolol apresentou P_{app} de $24 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$. Isso pode ser explicado devido a capacidade proteolítica da papaína em dilatar as junções oclusivas presentes nas células Caco-2 e favorecer a permeação da furosemida. O efluxo da ROD123 foi de 0,2 e a P_{app} do LY foi de $4,3 \times 10^{-7} \text{ cm.s}^{-1}$, indicando a presença de P-gp e a manutenção da integridade paracelular da monocamada de células Caco-2. Os resultados apresentados sugerem que a papaína complexada com ciclodextrinas poderia ser empregadas não somente como agente terapêutico no tratamento de patologias colônicas mas também como adjuvante farmacotécnico na promoção de permeação de fármacos que apresentam baixa permeabilidade oral, contribuindo significativamente com o aumento da eficácia terapêutica.

Palavras chave: papaína; citotoxicidade; permeabilidade; furosemida; transporte paracelular.

1. Introdução

A papaína (*Enzyme Classification* 3.4.22.2) é uma fitoenzima utilizada na terapêutica dermatológica para o tratamento de escaras e feridas devido a sua atividade proteolítica debridante (SHI *et al.*, 2009). Essa enzima atua sobre tecidos desvitalizados, auxiliando a remoção do tecido necrótico e estimulando o processo de cicatrização e anti-inflamatório (AZEVEDO *et al.*, 2017; MONETTA, 1987; SINGH; SINGH, 2012) além de possuir atividade antimicrobiana (SILVA JR *et al.*, 2016), promotora de permeação cutânea (LOPES *et al.*, 2008a) e oral (GRABOVAC *et al.*, 2007) sem interferir na integridade de tecidos sadios (FLINDT, 1979).

Atualmente somente algumas formulações farmacêuticas convencionais para administração tópica na forma de cremes, géis e pomadas contendo papaína estão disponíveis (DUTRA *et al.*, 2017) devido à sensibilidade da enzima, que pode não apresentar uma estabilidade adequada nessas formulações devido, principalmente, à presença de água e de metais que podem levar à perda de sua atividade (ZULLI *et al.*, 2010).

Para melhorar a estabilidade e prolongar sua atividade enzimática, a papaína pode ser imobilizada em estruturas poliméricas biodegradáveis denominadas ciclodextrinas (VARCA *et al.*, 2007). Esses excipientes são empregados nas formulações de sistemas farmacêuticos com o intuito de aumentar solubilidade, melhorar aspectos organolépticos, promover estabilidade, diminuir eventos adversos de fármacos e são consideradas seguras para administração oral (DAVIS; BREWSTER, 2004; KURKOV; LOFTSSON, 2013; UEKAMA; HIRAYAMA; IRIE, 1998).

Além disso, essa complexação pode favorecer a liberação dessa enzima no cólon. Segundo JUNG; KIM (2010), as ciclodextrinas são metabolizadas exclusivamente pela microbiota presentes no cólon capazes de transformar polissacarídeos complexos em açúcares mais simples e, posteriormente, em gás carbônico e água. Isso sugere que a papaína possa ser liberada no cólon após metabolização da ciclodextrina.

De acordo com VIEIRA *et al.* (2016), a administração oral de fármacos para liberação no cólon para o tratamento de diversas patologias tem ganhado crescente importância nos últimos anos. KUMAR; MISHRA (2008) afirma que a liberação colônica de fármacos permite o tratamento de diversas patologias locais, dentre elas, doenças inflamatórias intestinais e carcinomas além de oferecer diversas vantagens farmacocinéticas, tais como reduzir a dose total de fármaco administrada, diminuir flutuação plasmática e, conseqüentemente, levar à diminuição da expressão de possíveis reações adversas aos medicamentos favorecendo o sucesso farmacoterapêutico.

De acordo com SHIMPI; CHAUHAN; SHIMPI (2005); RENUKUNTALA *et al.* (2013) e YEWALE *et al.* (2015), a complexação de fármacos de origem proteica com ciclodextrinas é considerado uma estratégia farmacotécnica muito interessante que pode contribuir com o

aumento de sua estabilidade além de assegurar a liberação controlada e o aumento de sua biodisponibilidade. A complexação da papaína com ciclodextrinas pode ser capaz de contribuir com o aumento de sua estabilidade biológica (VARCA *et al.*, 2010) além de modular sua cinética de liberação ao longo do trato gastrointestinal.

Essas modificações podem permitir o avanço para o desenvolvimento de formulações contendo papaína que possam ser administradas por via oral e auxiliar no tratamento de processos patológicos ulcerativos gastrintestinais e também favorecer a atuação da enzima como promotora de permeação de ativos que apresentem baixa permeabilidade através do epitélio intestinal, melhorando, portanto, sua biodisponibilidade e eficácia terapêutica.

A avaliação da toxicidade e a capacidade promotora de permeação oral de biomoléculas é extremamente importante durante as fases iniciais de pesquisa e desenvolvimento, ou seja, é necessário que a segurança e eficácia sejam comprovadas mediante a realização de ensaios não clínicos *in vitro* que possam prever o comportamento de toxicidade e elucidar os mecanismos de permeação através de monocamada de células Caco-2 (SOUZA; FREITAS; STORPIRTIS, 2007).

As células Caco-2 são provenientes de um adenocarcinoma de cólon humano e são extensivamente empregadas nos estudos de avaliação da permeabilidade, absorção e citotoxicidade de moléculas que apresentem potencial terapêutico, pois sob condições adequadas, são capazes de diferenciar-se em enterócitos, formando uma monocamada homogênea de células cilíndricas polarizadas com microvilosidades na borda apical aderidas por complexos juncionais além de expressarem enzimas em suas microvilosidades e carreadores específicos para vitaminas e aminoácidos, mantendo as características morfológicas e funcionais das células epiteliais intestinais (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; GONÇALVES *et al.*, 2012; NATOLI *et al.*, 2012; SUGANO *et al.*, 2010).

Muitos estudos têm correlacionado a permeabilidade de fármacos através das células Caco-2 com a absorção oral e biodisponibilidade (ARTURSSON; KARLSSON, 1991; CHENG; LI; USS, 2008; MARSOUSI *et al.*, 2016) e, portanto, esse modelo é considerado o padrão ouro para avaliação da permeabilidade de diversas moléculas (LEE *et al.*, 2015) e preditivo com os modelos de permeabilidade *in vivo* (LENNERNÄS, 1998).

Entretanto, esses ensaios ainda são pouco realizados para formulações contendo papaína complexada com ciclodextrinas, embora a papaína seja considerada uma enzima extremamente versátil e que apresente uma ampla aplicação terapêutica.

2. Objetivos

2.1 Geral

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a capacidade da papaína livre e complexada com ciclodextrinas em promover a permeação de um fármaco de baixa permeabilidade através da monocamada de células Caco-2.

2.2 Específicos

- Avaliar a citotoxicidade da papaína livre e complexada com β -ciclodextrina e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina pela conversão do MTT e pela liberação de LDH empregando as linhagens celulares Caco-2;
- Quantificar a permeabilidade da furosemida através da monocamada de células Caco-2.

3. Materiais e métodos

3.1 Cultura celular

As células Caco-2 (linhagem de células adenocarcinoma de cólon humano) (ATCC[®] HTB-37[™]) foram cultivadas em meio DMEM (*Dubelcco's Modified Eagle's Medium*) alta glicose (Vitrocell[®]) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (Vitrocell[®]), 1% (v/v) de L-Glutamina (Vitrocell[®]) e 1% (v/v) de solução de antibióticos (10.000 UI.mL⁻¹ de penicilina, 10 mg.mL⁻¹ de estreptomicina e 1 mg.mL⁻¹ de anfotericina B) (Vitrocell[®]).

As células foram incubadas em estufa a 37°C a 5% de CO₂ com umidade controlada (Thermo Scientific[™], modelo 3425). O processo de descolamento celular ocorreu pela ação da solução de tripsina (2,5 g.L⁻¹) e EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético (0,38 g.L⁻¹) (Vitrocell[®]). Cada tripsinização foi registrada como uma passagem e os ensaios ocorreram a partir da segunda passagem.

3.2 Ensaio de citotoxicidade

Inicialmente, foram semeadas 15.10³ células Caco-2 em 100 μ L de meio de cultura em microplacas de 96 poços, seguindo a metodologia descrita no item 3.4 do Capítulo 1.

3.3 Avaliação da liberação de LDH

A avaliação da citotoxicidade por meio da quantificação da liberação de LDH foi realizada utilizando-se o kit *CytoTox 96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay* (Promega, Madison, WI, USA) de acordo com as recomendações do fabricante.

Inicialmente, as células Caco-2 foram semeadas na densidade de 20.10³ células em 100 μ L de meio de cultura em microplacas de 96 poços que foram incubadas por 24 horas

para adesão das células. Após 24 horas, os meios foram removidos e as células foram tratadas em sextuplicata com uma diluição seriada das soluções das amostras recém-preparadas contendo papaína livre e complexada, sendo que as concentrações foram as mesmas utilizadas para os ensaios de citotoxicidade realizados anteriormente, conforme mostrado no Capítulo 1, item 3.4. Após a aplicação das amostras, as microplacas foram incubadas por 8 horas.

Posteriormente, foram retirados 50 µL de sobrenadante e transferidos para outra microplaca de 96 poços e em seguida adicionou-se 50 µL da solução recém preparada do Reagente CytoTox 96® (Promega®) e a mistura foi incubada por 30 minutos. Após esse período, a reação foi interrompida com aplicação da solução de ácido acético 1M (Promega®). A solução de Triton™ X-100 9% (v/v) (Promega®) foi utilizada como controle positivo. Os valores de absorvâncias foram medidos a 490 nm utilizando o leitor de microplacas (modelo Synergy HT, Biotek®).

A viabilidade celular foi calculada de acordo com a equação: Liberação de LDH (%) = $(CT / CP) \times 100$, onde CT é a absorvância das células tratadas e CP é a absorvância do positivo.

3.4 Validação analítica parcial

Para a quantificação da furosemida (pureza $\geq 98\%$) (Sigma-Aldrich®) e do metoprolol (pureza $\geq 98\%$) (Sigma-Aldrich®) marcadores de alta e baixa permeabilidade, respectivamente, foi utilizado o método analítico de HPLC (*High performance liquid chromatography*) em fase reversa com detecção por fluorescência. A validação parcial do método cromatográfico consistiu na verificação dos parâmetros de seletividade, precisão, exatidão e linearidade (BRASIL, 2017).

O tampão que compõe a fase móvel foi preparado utilizando-se fosfato de potássio monobásico (Labsynth®) (20 mM), pH 3,0. O ajuste do pH foi realizado com o auxílio de uma solução de ácido fosfórico (Labsynth®) (20% (v/v)). Essa solução foi filtrada em membrana de acetato de celulose de 47 mm de diâmetro e poro de 0,45 µm (Pall Corporation®).

A Tabela 1 resume todas as condições cromatográficas utilizadas para a quantificação dos marcadores.

Tabela 1. Condições cromatográficas utilizadas para a quantificação da furosemida e do metoprolol nas amostras obtidas durante os ensaios de permeabilidade.

Condições cromatográficas	Marcadores	
	Furosemida	Metoprolol
Detector	Fluorescência	
Comprimento de onda	Excitação: 268 nm Emissão: 410 nm	Excitação: 230 nm Emissão: 405 nm
Fase móvel	Tampão fosfato (20 mM) e acetonitrila (J.T. Baker®) (70:30 (v/v))	Tampão fosfato (20 mM) e metanol (J.T. Baker®) (60:40 (v/v))
pH	3,0	
Fase estacionária	Coluna cromatográfica da marca Agilent Technologies modelo Eclipse XDB-C18, de 150 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, contendo partículas do tamanho de 5 µm	
Diluyente	Água ultrapurificada (sistema de purificação de água por osmose reversa, modelo OS20 LZ, acoplado a um ultrapurificador, modelo Master System P&D, Gehaka®) e metanol (J.T. Baker®) (90:10 (v/v))	
Volume de injeção (µL)	20	
Fluxo da fase móvel (mL.min⁻¹)	1,0	

(Adaptado de LOZOYA-AGULLO *et al.*, 2015).

3.4.1 Seletividade

A seletividade é definida como a capacidade do método em distinguir o composto de interesse das demais substâncias presentes na amostra. Esse parâmetro foi verificado por meio da comparação dos cromatogramas obtidos a partir das análises das soluções-padrão de furosemida, metoprolol e das amostras contendo papaína livre, papaína complexada com β-ciclodextrina, papaína complexada com 2-hidroxipropol-β-ciclodextrina com os cromatogramas obtidos a partir do “branco” (solução de tampão de Hanks) na ausência do analito de interesse, com a finalidade de garantir a ausência de picos interferentes. Esse parâmetro foi calculado de acordo com a fórmula: $\text{Seletividade (\%)} = \frac{MA_{\text{Branco}}}{MA_{\text{Amostra}}} \times 100$ (Furosemida ou Metoprolol), onde MA = média da área do pico do cromatograma (BRASIL, 2017).

3.4.2 Precisão

A precisão de um método analítico representa o grau de concordância dos resultados obtidos quando um procedimento analítico é aplicado repetidamente, sendo expressa pela fórmula $DPR (\%) = DP \times 100 / C_{\text{média}}$, onde $DPR (\%)$ = desvio padrão relativo em porcentagem; DP = desvio padrão da triplicata; $C_{\text{média}}$ = concentração média determinada (BRASIL, 2017).

3.4.3 Exatidão

A exatidão de métodos analíticos é uma medida de erro sistemático e é definida como a concordância entre o valor determinado e o valor aceito com verdadeiro sendo calculada pela fórmula: $\text{Erro relativo } (\%) = (C_{\text{Real}} - C_{\text{Teórica}}) \times 100 / C_{\text{Teórica}}$, onde C é a concentração (BRASIL, 2017).

3.4.4 Linearidade

A linearidade indica a relação entre concentração de analito e resposta do método representada pela área do sinal cromatográfico sendo obtida por meio da construção da curva de calibração, que representa a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito. Para isso, foram construídas duas curvas analíticas com intervalos entre $1 - 100 \text{ ng.mL}^{-1}$ e $100 - 1000 \text{ ng.mL}^{-1}$ (BRASIL, 2017).

3.5 Avaliação da permeabilidade da furosemida através da monocamada de células Caco-2

Células Caco-2 foram semeadas na densidade de 20.10^3 células no compartimento doador do poço da Transwell® contendo 24 poços com suporte de polycarbonato de $0,4 \mu\text{m}$ de poro, e área de $0,33 \text{ cm}^2$ (Corning®). As células foram incubadas em estufa de CO_2 a 37°C com umidade controlada e os meios foram substituídos a cada 2 dias.

Após 21 dias, os meios foram aspirados e substituídos pelo tampão de Hanks contendo HEPES em pH 7,4 (Vitrocell®) e a placa foi incubada sob agitação de 65 rpm por 15 minutos para equilíbrio. Após esse período, a integridade das monocamadas de células foi avaliada por meio da resistência elétrica transepitelial (RET) que foi medida utilizando-se um voltímetro (Millicell® ERS-2, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) em cada membrana. Foram considerados íntegras as membranas que apresentaram valores acima de $200 \Omega.\text{cm}^2$ (HUBATSCH; RAGNARSSON; ARTURSSON, 2007).

O ensaio foi realizado com a adição das soluções das amostras recém-preparadas de papaína livre e complexada com β -ciclodextrina e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina ($0,7 \mu\text{M}$) concomitante à adição da solução de furosemida (Sigma-Aldrich®) ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ao compartimento apical para avaliar a capacidade desses compostos em promover a permeação da furosemida, considerada um fármaco de baixa permeação (GRANERO *et al.*,

2010). Furosemida e metoprolol (Sigma-Aldrich®) (100 µg.mL⁻¹) foram utilizados como controles negativo e positivo, respectivamente. Os ensaios foram realizados unidirecionalmente do compartimento apical (doador - representando o lúmen intestinal) para o basolateral (receptor - representando a circulação sanguínea) a 37°C sob agitação de 65 rpm por 2 horas.

A permeabilidade foi calculada plotando-se as concentrações acumuladas de furosemida e metoprolol quantificadas nas coletas *versus* o tempo de coleta, obtendo-se uma curva de concentração x tempo e sua respectiva inclinação. O coeficiente de permeabilidade aparente (P_{app}) (cm.s⁻¹) foi calculado de acordo com a equação: $P_{app} = V_R / (A \times C_0) \times dC/dT$, onde V_R é o volume do compartimento receptor, A é a área do suporte de cultivo das células, C_0 é a concentração inicial do fármaco adicionado no compartimento doador e dC/dT é a inclinação da curva de concentração *versus* tempo.

A permeabilidade paracelular foi avaliada por meio da quantificação do *Lucifer Yellow* (LY) (Invitrogen™) (50 µg.mL⁻¹) do compartimento doador para o compartimento receptor. O transporte de LY foi estimado por fluorescência (λ_{ex} : 405 nm; λ_{em} : 535 nm) utilizando o leitor de microplacas (modelo SpectraMax® i3, Molecular Devices). A curva de calibração do LY foi linear ao longo do intervalo de concentração de 0,02 - 3,1 µg.mL⁻¹.

A atividade da glicoproteína-P (P-gp), uma importante bomba de efluxo, foi avaliada mediante a quantificação da rodamina 123 (ROD123) (Sigma-Aldrich®) (5 µM) do compartimento doador (A) para o receptor (B) e vice-versa. A taxa de efluxo foi calculada de acordo com a fórmula: Taxa de efluxo = $P_{app} (B-A) / P_{app} (A-B)$. A concentração de ROD123 foi estimada por fluorescência (λ_{ex} : 485 nm; λ_{em} : 535 nm) utilizando o leitor de microplacas (modelo SpectraMax® i3, Molecular Devices).

3.6 Microscopia de fluorescência confocal

As marcações fluorescentes foram realizadas para visualização de determinados componentes das células Caco-2 por meio da coloração com Alexa Fluor™ 488 Faloidina (Thermo Fisher Scientific) para a marcação de filamentos de actina presentes no citoesqueleto seguido de coloração por DAPI (4',6-diamidina-2'-phenylindole dihydrochloride) (Sigma-Aldrich®) para marcação de núcleo. As soluções estoque dos corantes foram preparadas de acordo com as recomendações dos fabricantes.

Primeiramente, as membranas do Transwell® foram lavadas 2 vezes com PBS e fixadas com formaldeído (Thermo Fisher Scientific) 4% (v/v) em PBS por 10 minutos. Em seguida, as membranas foram lavadas 2 vezes com PBS e as células foram permeabilizadas com Triton™ X-100 (Sigma-Aldrich®) 0,2% (v/v) em PBS e incubadas por 7 minutos. Após esse período, as membranas foram lavadas 2 vezes com PBS e o bloqueio de ligações não

específicas foi realizado com BSA (*Bovine Serum Albumin*) (Sigma Aldrich®) 1% (m/v) em PBS (PBS-BSA) por 30 minutos e as membranas foram lavadas mais 2 vezes com PBS.

Posteriormente, ao abrigo da luz, as células foram primeiramente marcadas com Alexa Fluor™ 488 Faloidina (diluição 1:40 em PBS-BSA), incubadas por 10 minutos e as membranas foram lavadas 2 vezes com PBS. Em seguida, as células foram marcadas com DAPI (1:10000 em PBS), incubadas por 10 minutos e as membranas foram lavadas 2 vezes com PBS. As lâminas foram montadas e as células foram visualizadas no microscópio de fluorescência confocal (microscópio confocal Zeiss LSM 880).

3.7 Análise estatística

Os ensaios foram realizados em duplicatas independentes e os resultados foram submetidos à análise *One-way* ANOVA e teste de Bonferroni para determinação de diferenças estatísticas entre os grupos de amostras e os controles ao nível de significância de 5% utilizando o programa *GraphPad Prism* versão 7.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

4. Resultados e discussão

4.1 Ensaio de citotoxicidade

Os ensaios de segurança empregando células são frequentemente utilizados para a triagem inicial de moléculas e avaliação de sua atividade sobre a proliferação celular ou efeitos citotóxicos diretos que conduzem eventualmente à morte celular. Além disso, o emprego de cultura celular é uma ferramenta útil na predição da permeabilidade de fármacos através de monocamada de células que mimetizam a condição de barreira do epitélio intestinal (KRATZ *et al.*, 2011).

Para avaliação da toxicidade das amostras contendo papaína, foram empregados dois diferentes ensaios de citotoxicidade para verificar o possível efeito tóxico dessas amostras sobre a cadeia respiratória mitocondrial das células Caco-2 com ou sem tratamento.

As amostras contendo papaína apresentaram baixa citotoxicidade nas menores concentrações testadas durante o período 48 horas sendo indicativo que houve a preservação da integridade bioquímica mitocondrial dessas células (Figura 1).

Entretanto, a papaína é uma enzima proteolítica que possui um efeito semelhante à ação da tripsina, capaz de promover o descolamento de células aderidas dependendo da concentração utilizada. Ou seja, a papaína não é capaz de provocar disfunções mitocondriais, entretanto, dependendo da concentração, ela pode degradar determinados resíduos de proteínas envolvidas na adesão e interação célula-célula fazendo com que essas células percam a conexão com a matriz e tornem-se incapazes de exercerem seu metabolismo e ativem mecanismos de morte celular - anoikis, culminando na baixa viabilidade celular em concentrações mais elevadas (FRISCH; SCREATON, 2001).

Para investigar se a redução da viabilidade celular poderia ser atribuída a danos na membrana celular, foi realizado o ensaio de liberação de LDH. Essa enzima está presente no meio citosólico e é liberada para o meio extracelular após um dano na membrana celular. A LDH catalisa a conversão de piruvato e lactato concomitantemente com a conversão de nicotinamida adenina reduzido (NAD⁺) em nicotinamida adenina oxidada (NADH). Posteriormente, o NADH é usado na conversão um sal tetrazólio em formazan. Quanto maior a intensidade da coloração, maior é a perda de integridade da membrana celular (MAES *et al.*, 2015). Sendo assim, essa enzima pode ser considerada um biomarcador de danos à membrana plasmática e citotoxicidade.

As mesmas concentrações foram empregadas para a avaliação da liberação de LDH pelo período de 8 horas (Figura 2). Embora as amostras não tenham sido capazes de promover a liberação de LDH de forma significativa em relação ao controle ($p < 0,001$), a amostra de papaína complexada com 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina foi a que apresentou maiores valores de liberação de LDH em relação às demais amostras

HUI *et al.* (2011); THOMPSON (1997); KISS *et al.* (2010), sugerem que a toxicidade das ciclodextrinas é proveniente de sua capacidade de remoção dos componentes lipídicos presentes na bicamada lipídica das células.

LEROY-LECHAT *et al.* (1994) afirma que as ciclodextrinas podem interagir com a bicamada lipídica das células e formar complexos de inclusão com o colesterol e fosfolipídeos e lipoproteínas presentes levando à desestabilização dessa camada.

Nas concentrações avaliadas, o efeito da liberação de LDH não foi pronunciado e a utilização das ciclodextrinas é considerada segura para administração oral por diversos autores (IRIE; UEKAMA, 1997; DEL VALLE, 2004; STELLA; HE, 2008).

Nessas condições, as amostras contendo papaína não foram capazes de promover danos à membrana celular mediante a interação com os lipídeos presentes na membrana plasmática o que corrobora o possível processo de morte celular ser provocada pelo desadesão das células, que ativa mecanismos apoptóticos ao invés de mecanismos necróticos. A papaína não é capaz de desestabilizar a membrana ao ponto de fazer com que haja perda da integridade e extravasamento de LDH para o meio extracelular.

Os ensaios realizados foram importantes e servem como indicadores de mecanismos de danos ao epitélio intestinal que podem levar à perda da integridade da barreira e aumento da permeabilidade.

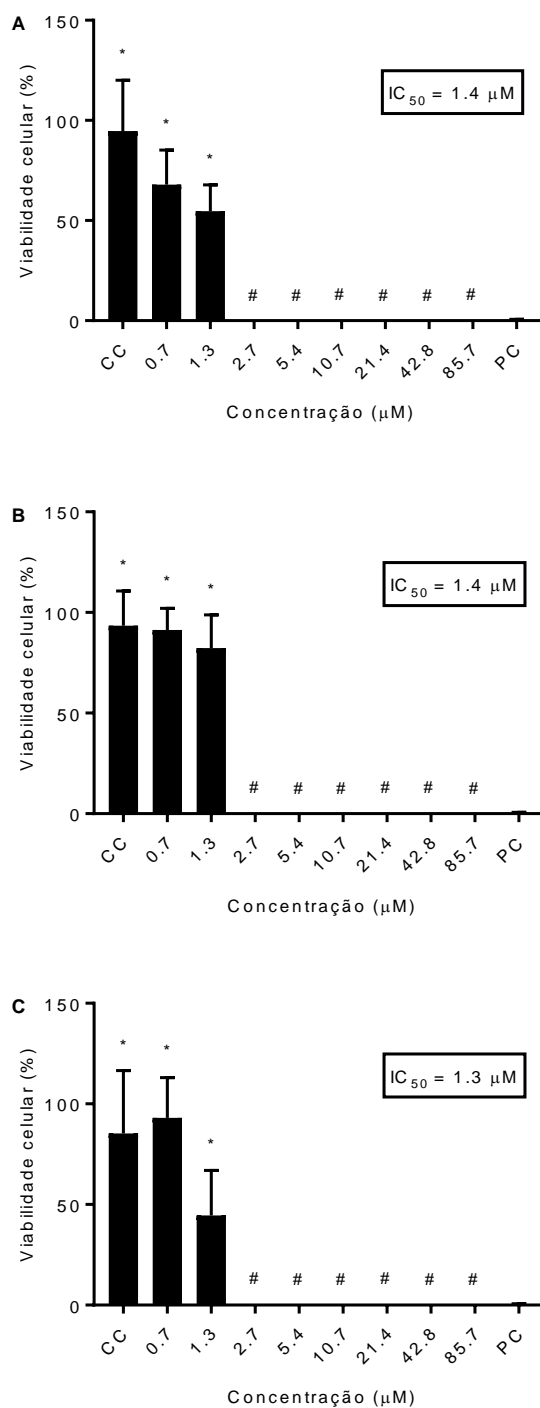


Figura 1. Avaliação da citotoxicidade da papaína livre e complexada com β -ciclodextrina e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina sobre células Caco-2 após 48 horas de incubação. **CC.** Controle de células; **PC.** Controle Positivo (1% (v/v) de Triton™ X-100); **A.** Papaína livre; **B.** Papaína complexada com β -ciclodextrina; **C.** Papaína complexada com 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina; **#.** Indica ausência de células. Os dados representam média \pm desvio padrão de dois ensaios independentes ($n = 12$) * $p < 0,0001$ comparado ao controle positivo seguido de análise *One-way* ANOVA e teste de Bonferroni.

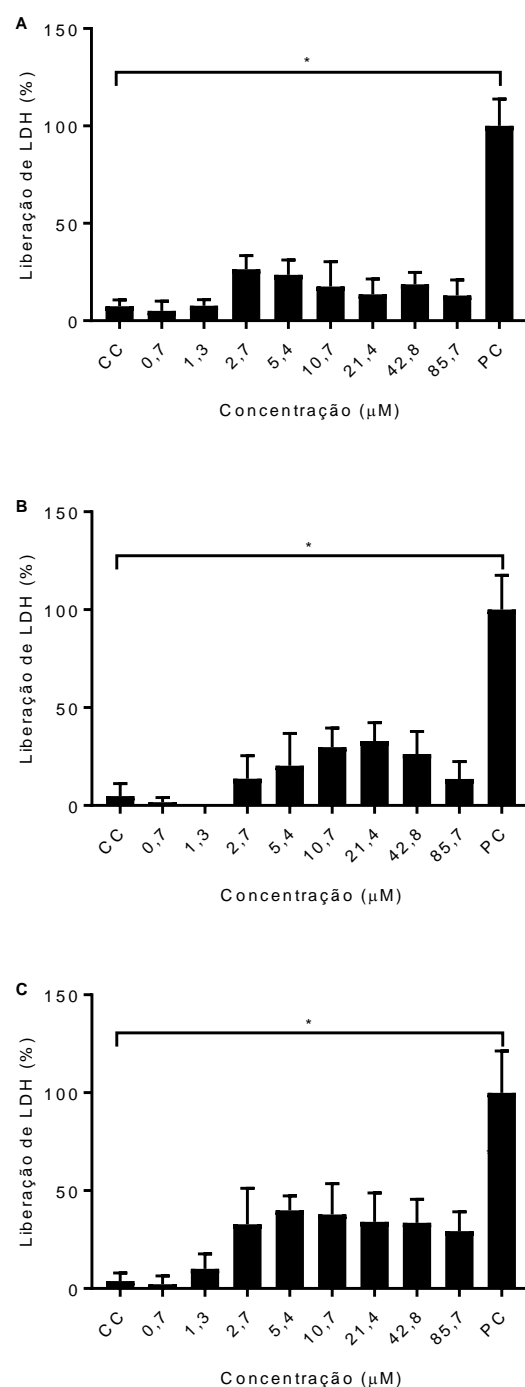


Figura 2. Avaliação da citotoxicidade da papaína livre e complexada com β-ciclodextrina e 2-hidroxiopropil-β-ciclodextrina sobre células Caco-2 após 8 horas de incubação. **CC.** Controle de células; **PC.** Controle Positivo (9% (v/v) de Triton™ X-100); **A.** Papaína livre; **B.** Papaína complexada com β-ciclodextrina; **C.** Papaína complexada com 2-hidroxiopropil-β-ciclodextrina. Os dados representam média ± desvio padrão de dois ensaios independentes (n = 12) *p < 0,0001 comparado ao controle positivo seguido de análise *One-way* ANOVA e teste de Bonferroni.

4.2 Validação analítica parcial

Os métodos desenvolvidos demonstraram atender às especificações analíticas para os analitos em estudo, não ocorrendo interferências perceptíveis em relação aos picos da furosemida e do metoprolol.

As amostras demonstraram não interferir na detecção da furosemida e do metoprolol, indicando que o método é sensível e seletivo. O Erro Relativo (%) e o DPR (%) encontrados foram entre 10 e 15%, demonstrando adequabilidade nos parâmetros de Precisão e Exatidão. O método também possui uma boa linearidade, apresentando coeficientes de correlação (R) acima de 0,99, indicando proporcionalidade entre as áreas obtidas e as respectivas concentrações encontradas. Foram construídas duas curvas de calibração com faixas de concentração distintas para que houvesse manutenção da linearidade do método tendo em vista a sensibilidade do método escolhido (BRASIL, 2017) (Tabelas 2-5, Figuras 3-6).

Tabela 2. Avaliação do parâmetro de seletividade e porcentagens de interferências na sensibilidade do método cromatográfico da furosemida.

Concentração de furosemida: 100 ng.mL ⁻¹	
Amostra	Porcentagem (%)
Furosemida (100 ng.mL ⁻¹)	100
Branco	0,237336022
PPN	0,261637384
PPN-β-CD	0,260888689
PPN-HP-β-CD	0,285210848
Concentração de furosemida: 1000 ng.mL ⁻¹	
Furosemida (1000 ng.mL ⁻¹)	100
Branco	0,025286536
PPN	0,02787568
PPN-β-CD	0,027795912
PPN-HP-β-CD	0,030387272

Branco: tampão de Hanks; PPN: papaína livre; PPN-β-CD: papaína complexada com β-ciclodextrina; PPN-HP-β-CD: papaína complexada com 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina.

Tabela 3. Avaliação dos parâmetros de precisão e exatidão da furosemda.

Concentração teórica (ng.mL ⁻¹)	Área	Concentração real (ng.mL ⁻¹)	Erro relativo (%)	DPR (%)
10	125142	11,21975689	10,64849008	7,258806952
10	113018	10,1199746	0,596168995	
10	109259	9,778991292	-2,599688329	
50	606386	54,87396589	8,232674344	9,223228613
50	542117	49,04404935	-2,496919788	
50	506240	45,7896045	-8,785648408	
100	1196777	108,4290276	6,931979858	6,970048909
100	1108398	100,4120646	-0,186814526	
100	1041966	94,38593977	-5,990099833	
250	3030814	277,3937344	9,425536236	9,506539972
250	2772613	253,4618593	0,78006334	
250	2511096	229,2226342	-8,676241369	
500	5934315	546,51052	7,793001967	7,4132091
500	5347260	492,0981555	-2,167364706	
500	5161255	474,8579108	-5,40679067	
750	9125789	842,3186579	10,7585349	10,96401226
750	8128180	749,8532765	-0,615867928	
750	7340539	676,8491983	-10,11298828	

DPR: desvio padrão relativo.

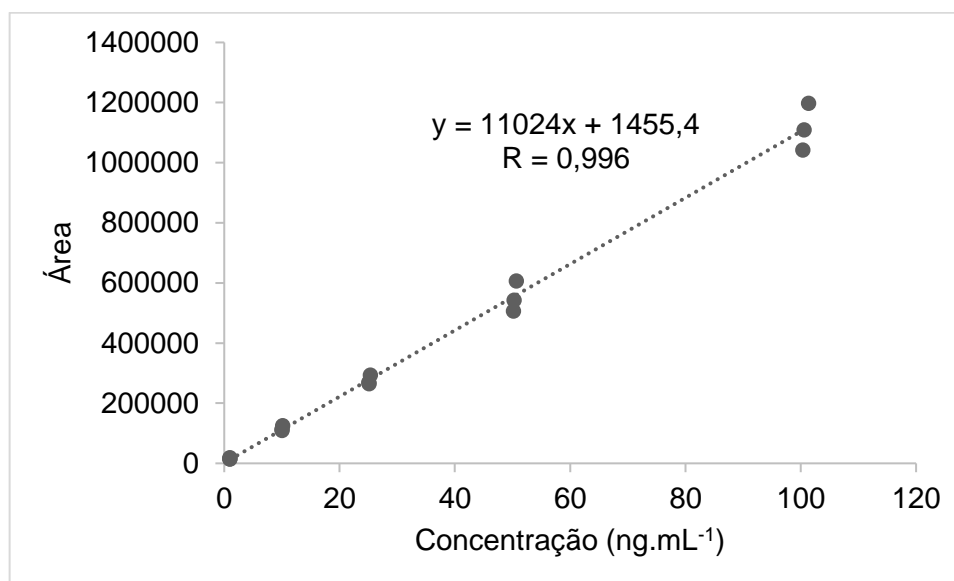


Figura 3. Linearidade da furosemda nas concentrações entre 1 e 100 ng.mL⁻¹.

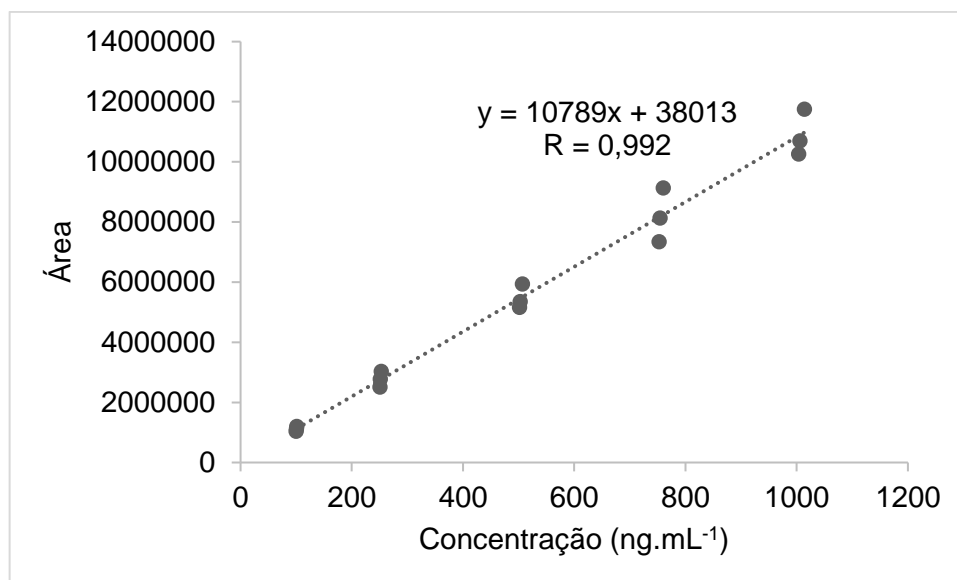


Figura 4. Linearidade da furosemida nas concentrações entre 100 e 1000 ng.mL⁻¹.

Tabela 4. Avaliação do parâmetro de seletividade e porcentagens de interferências na sensibilidade do método cromatográfico do metoprolol.

Concentração de metoprolol: 100 ng.mL ⁻¹	
Amostra	Porcentagem (%)
Metoprolol (100 ng.mL ⁻¹)	100
Branco	0,890236634568555
Concentração de metoprolol: 1000 ng.mL ⁻¹	
Metoprolol (1000 ng.mL ⁻¹)	100
Branco	0,147842191751957

Tabela 5. Avaliação dos parâmetros de precisão e exatidão do metoprolol.

Concentração teórica (ng.mL ⁻¹)	Área	Concentração real (ng.mL ⁻¹)	Erro relativo (%)	DPR (%)
10	82128	10,21951252	2,195125156	7,66538
10	83572	10,40925038	4,092503778	
10	72945	9,012890086	-9,871099139	
50	394196	51,22443992	2,448879837	5,56167
50	408670	53,12628605	6,252572104	
50	366484	47,58315485	-4,833690296	
100	763631	99,76724263	-0,232757375	2,92174
100	787449	102,8968662	2,896866172	
100	743057	97,06387228	-2,936127718	
250	2003718	251,0350059	0,414002346	5,61925
250	2136407	267,95013	7,180052012	
250	1914896	239,7120239	-4,115190454	
500	3973991	502,2043751	0,440875019	5,08618
500	4192512	530,0613176	6,012263526	
500	3791091	478,888379	-4,222324206	
750	5928252	751,332543	0,177672395	1,64651
750	5931368	751,729769	0,230635868	
750	6099527	773,1665902	3,088878691	

DPR: desvio padrão relativo.

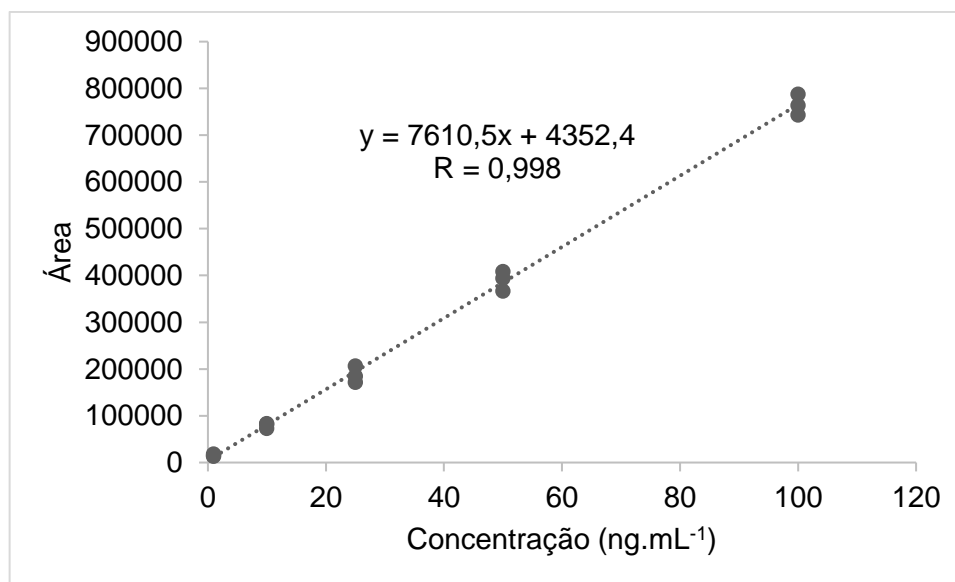


Figura 5. Linearidade da metoprolol nas concentrações entre 1 e 100 ng.mL⁻¹.

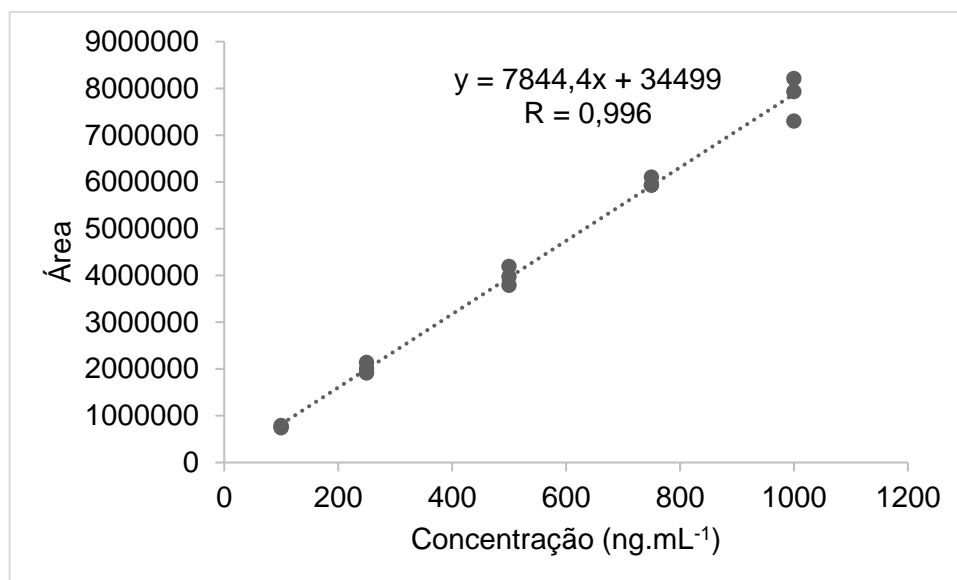


Figura 6. Linearidade da metoprolol nas concentrações entre 100 e 1000 ng.mL⁻¹.

4.3 Avaliação da permeabilidade da furosemida através da monocamada de células Caco-2

O epitélio intestinal é considerado uma importante barreira fisiológica para o controle da permeação de água, íons, aminoácidos e fármacos além de proteger contra a entrada de micro-organismos e patógenos. Esse epitélio é constituído principalmente por células colunares absorptivas altamente polarizadas denominadas de enterócitos que são fortemente ligados por complexos juncionais proteicos intercelulares, localizados principalmente na porção apical dessas células (LUNDQUIST; ARTURSSON, 2016).

Esses complexos juncionais apicais são compostos por três regiões distintas, denominadas de junções oclusivas, aderentes e desmossomos que permitem a manutenção morfológica polarizada da monocamada de células. Entretanto, segundo CANO-CEBRIÁN *et al.* (2005), as junções oclusivas são as principais responsáveis pelo controle seletivo da permeação paracelular de nutrientes e xenobióticos.

As junções são compostas por proteínas ramificadas transmembranares com domínio extracelular predominantemente da família das claudinas e ocludinas. Os domínios extracelulares dessas proteínas formam alças que se ligam às alças correspondentes de células adjacentes e que interagem para bloquear o espaço intercelular, criando uma vedação entre as duas células. Essas junções também se conectam com o citoesqueleto e estabilizam a adesão célula-célula (GUMBINER, 1996).

As junções oclusivas podem ser abertas por mecanismos intracelulares que atuam nos mecanismos de sinalização envolvidos na modulação dessas junções ou por mecanismos extracelulares, as quais interrompem diretamente as interações de reconhecimento entre as proteínas (MAHER; MRSNY; BRAYDEN, 2016).

Atualmente, a avaliação da permeabilidade de fármacos para administração oral durante as fases iniciais da pesquisa não clínica é fundamental para o desenvolvimento de novas formulações e é considerado um critério importante durante a triagem e a seleção de novos fármacos para ensaios clínicos posteriores (OLTRA-NOGUERA *et al.*, 2015).

Para isso, o modelo de avaliação de permeabilidade e metabolismo utilizando monocamada de células Caco-2 é amplamente utilizado como uma alternativa ao uso de animais para avaliação de permeação (AMIDON *et al.*, 1995), pois além de apresentar elevada reprodutibilidade e precisão, também apresenta uma forte correlação com a dose absorvida em humanos (INGELS *et al.*, 2002).

As células Caco-2 que crescem aderidas às membranas permeáveis mantêm muitas das características morfológicas e funcionais tais como a presença de microvilosidades na borda apical, enzimas metabolizadoras e transportadores de efluxo incluindo a glicoproteína-P (P-gp) encontrados nos enterócitos e permitem a avaliação da permeabilidade intestinal em condições controladas (MARSOUSI *et al.*, 2016).

A P-gp é uma bomba de efluxo dependente de energia que atua sobre diversos fármacos inibindo a sua absorção, e é considerada um dos principais mecanismos de resistência tendo em vista que proporciona a variabilidade de diversos parâmetros farmacocinéticos (BENET; CUMMINS; WU, 2004).

A presença de diversas enzimas metabolizadoras e enzimas do citocromo P450 também são encontradas na membrana apical dos enterócitos do complexo P450 na membrana apical dos enterócitos (ÖLANDER *et al.*, 2016). Dessa forma, a biodisponibilidade oral de fármacos pode ser dificultada pela presença de transportadores de efluxo e de enzimas metabolizadoras que impedem a absorção dessas moléculas.

A integridade biofísica das membranas formadas pelas células Caco-2 cultivadas sobre os insertores de polycarbonato (Transwell®), foi monitorada por meio da determinação da Resistência Elétrica Transepitelial (RET) nos períodos iniciais e após 2 horas de ensaio de permeabilidade (Figura 7).

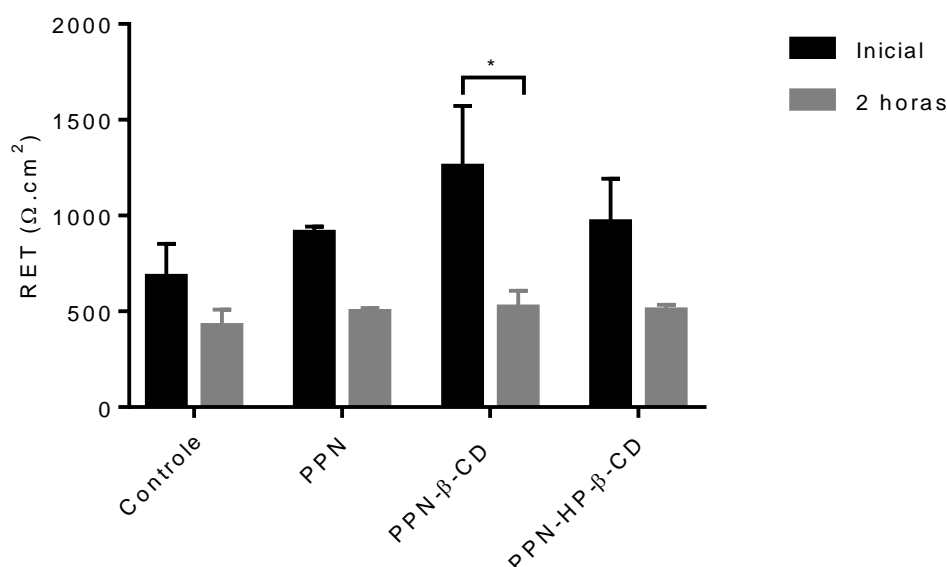


Figura 7. Valores de RET (Resistência Elétrica Transepitelial) ($\Omega\cdot\text{cm}^2$) em monocamada de células Caco-2 antes e após a exposição por 2 horas das células às amostras de papaína na concentração de $0,7\ \mu\text{M}$ e furosemida na concentração de $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. **PPN.** papaína livre; **PPN-β-CD.** papaína complexada com β-ciclodextrina; **PPN-HP-β-CD.** papaína complexada com 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina. Os dados representam média \pm desvio padrão * $p < 0,05$ seguido de análise *Two-way* ANOVA e teste de Bonferroni.

Nos ensaios de permeabilidade utilizando a monocamada de células Caco-2, foi utilizada a menor concentração de papaína capaz de proporcionar a maior viabilidade celular, ou seja, optou-se por empregar a menor concentração avaliada durante os ensaios de citotoxicidade, realizados previamente, para minimizar efeito proteolítico dessa enzima e ainda assim realizar a avaliação de sua capacidade em promover a permeação da furosemida, um fármaco conhecido por apresentar baixa permeabilidade intestinal.

Inicialmente, as RET apresentavam valores acima de $500\ \Omega\cdot\text{cm}^2$, indicando que a monocamada de células apresentava elevada coesividade devido à presença expressiva de junções celulares que mantiveram a integridade da barreira epitelial ao longo dos 21 dias de cultivo.

Após a aplicação das amostras contendo papaína, foi verificado que houve uma diminuição expressiva dos valores de RET comparando-se aos valores iniciais obtidos, embora os valores ainda sejam considerados elevados. Resultados semelhantes também foram encontrados por GUGGI; BERNKOP-SCHNÜRCH (2005).

A diminuição dos valores de RET sugere que, mesmo em concentrações muito pequenas, a papaína foi capaz de exercer seu mecanismo de ação proteolítico frente às

proteínas que compõem a matriz extracelular e os complexos juncionais que mantêm a integridade da barreira epitelial (DALET-FUMERON; BOUDJENNAH; PAGANO, 1998), promovendo a diminuição da coesividade intercelular proporcionada pelas junções celulares e contribuir com a permeação paracelular da furosemida.

A permeabilidade oral é a capacidade que o composto tem em atravessar a barreira epitelial e é considerado o fator decisivo para que a molécula seja absorvida e exerça sua atividade terapêutica. Geralmente, moléculas mais lipofílicas e de moderado peso molecular podem se difundir e serem absorvidas atravessando a membrana celular - transporte transcelular e moléculas hidrofílicas e de baixo peso molecular são absorvidas por terem a capacidade de passarem entre os espaços intercelulares - transporte paracelular (KARASOV, 2017).

O transporte passivo transcelular ocorre por simples difusão, por meio do gradiente de concentração e sem gasto energético, entretanto, o fármaco deve ser lipofílico e apresentar baixo peso molecular (ABUHELWA *et al.*, 2016). O transporte passivo paracelular ocorre pela passagem dos fármacos entre os espaços intercelulares de células adjacentes, dos quais, moléculas de baixo a médio peso molecular e hidrofílicas podem se difundir através das junções celulares (SADEGHI *et al.*, 2008).

Para a avaliação da permeabilidade intestinal de fármacos, diversas agências regulatórias preconizam a utilização de monocamada de células Caco-2 como modelo para a quantificação da fração permeada e para a classificação da permeabilidade, de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) (PHAM-THE *et al.*, 2013).

De acordo com o SCB, a furosemida é classificada como classe IV, ou seja, ela possui baixa solubilidade e baixa permeabilidade (LINDENBERG; KOPP; DRESSMAN, 2004). GRANERO *et al.* (2010) descrevem que a baixa permeabilidade transcelular apresentada é devido a características físico-químicas da molécula e também a ativação de mecanismos de múltipla resistência aos fármacos. A furosemida, por ser considerada um ácido fraco, não sendo capaz de atravessar a camada epitelial por simples difusão. Além disso, furosemida é um substrato da P-gp, ou seja, essa bomba de efluxo é responsável pela intensa secreção desse fármaco para o lúmen intestinal.

Apesar de apresentar uma baixa extensão de absorção, uma pequena parcela da furosemida é capaz de ser absorvida através de mecanismos paracelulares, embora essa via também não seja considerada muito acessível para moléculas que apresentem carga e elevado peso molecular (AVDEEF; TAM, 2010).

Essas características corroboram o fato da furosemida ter uma absorção muito limitada ao longo do trato gastrointestinal, o que contribui com sua baixa biodisponibilidade e pode comprometer a eficácia terapêutica.

As amostras de papaína livre e complexada com β -ciclodextrina e com 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina foram capazes de promover o aumento da permeação da furosemida de forma muito significativa (Tabela 6 e Figura 8).

De acordo com YEE (1997), um fármaco é considerado pouco absorvido (0-20%) quando o P_{app} é menor que $1 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$, moderadamente absorvido (20-70%) quando o P_{app} está compreendido entre 1 e $10 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$ e bem absorvido (70-100%) quando o P_{app} é maior que $10 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$.

Embora a classificação da furosemida não tenha sofrido alteração e ainda tenha sido considerada pouco absorvida, é possível observar que a permeabilidade aparente (P_{app}) desse fármaco associada às formulações contendo papaína foi cerca de 2,5 vezes maior comparado ao valor de P_{app} da furosemida isolada (controle negativo) (Tabela 6 e Figura 8).

Tabela 6. Permeabilidade aparente (P_{app}) (cm.s^{-1}) da furosemida na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ isolada e associada às amostras contendo papaína na concentração de $0,7 \mu\text{M}$ e do metoprolol na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ através da monocamada de células Caco-2 em pH 7,4.

Amostra	$P_{app} (\times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1})$
Furosemida	$2,8 \pm 0,0$
Furosemida e papaína livre	$6,5 \pm 0,1$
Furosemida e papaína complexada com β -ciclodextrina	$7,0 \pm 0,5$
Furosemida e papaína complexada com 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina	$7,0 \pm 1,1$
Metoprolol	$24 \pm 1,4$

Os dados representam média \pm desvio padrão.

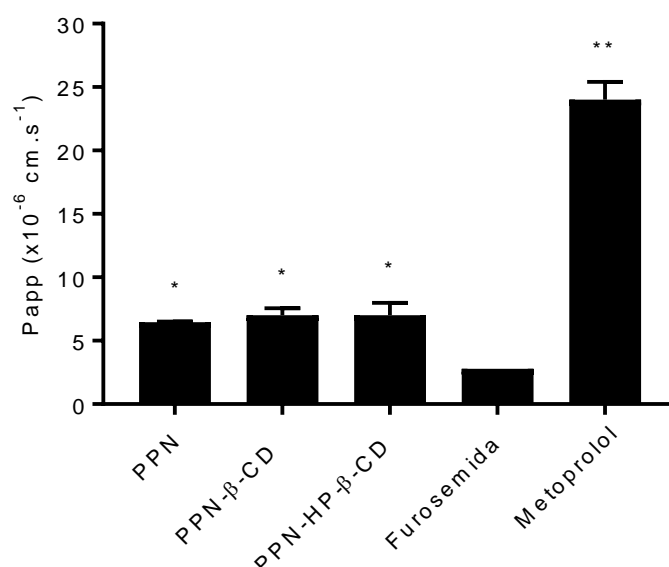


Figura 8. Permeabilidade aparente (P_{app}) (cm.s^{-1}) da furosemida na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ isolada e na presença das amostras contendo papaína na concentração de $0,7 \mu\text{M}$ e do metoprolol na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em monocamada de células Caco-2 em pH 7,4 após exposição de 2 horas. **PPN.** papaína livre; **PPN-β-CD.** papaína complexada com β-ciclodextrina; **PPN-HP-β-CD.** papaína complexada com 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina. Os dados representam média \pm desvio padrão * $p < 0,01$; ** $p < 0,0001$ comparado ao controle negativo (furosemida) seguido de análise *One-way* ANOVA e teste de Bonferroni.

Os valores de P_{app} da furosemida e do metoprolol estão de acordo com os valores encontrados por outros autores que também avaliaram a permeação desses fármacos através da monocamada de células Caco-2 (FERNANDES *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2007; SKOLNIK *et al.*, 2010).

De acordo com LEE *et al.* (2016), as junções celulares presentes entre as células do epitélio intestinal limitam significativamente a permeação paracelular de diversos compostos. Modular a abertura dessas junções é um fator importante para melhorar a biodisponibilidade de proteínas e fármacos de baixa permeação.

Atualmente, os principais promotores de permeação intestinal utilizados são ácidos graxos de cadeia curta, acilcartininas, derivados de sais biliares e EDTA que exercem seu mecanismo de ação ou através da fluidização da membrana plasmática o que, conseqüentemente, aumenta a permeação transcelular ou alterando a modulação da expressão e atividade das junções celulares, favorecendo a permeação paracelular (MCCARTNEY; GLEESON; BRAYDEN, 2016).

A concentração de papaína utilizada foi suficiente para dilatar as junções oclusivas presentes nas células Caco-2 e favorecer a permeação da furosemida. Entretanto, diferentemente dos outros promotores de permeação, a papaína possui o benefício terapêutico de ser uma enzima proteolítica capaz de estimular o processo de cicatrização e reparação tecidual além de diminuir o processo inflamatório (COLLARD; ROY, 2010). Essas características poderiam ser exploradas visando o tratamento de patologias intestinais inflamatórias e permeação de fármacos.

Embora a segurança da utilização da papaína em formulações farmacêuticas tenha sido demonstrada por diversos autores (LOPES *et al.*, 2008b; MÜLLER *et al.*, 2016; VARCA *et al.*, 2007), atualmente, existem poucos estudos que avaliam a capacidade dessa enzima em promover a permeação de outros fármacos.

LOPES *et al.* (2008a) avaliou o potencial da papaína e do óleo de pequi associados ou não em formulações semissólidas como promotores de penetração cutânea para o diclofenaco de sódio através de pele humana. A avaliação *in vitro* revelou que a papaína exerceu uma melhor ação promotora de penetração cutânea do que óleo de pequi.

BOCK *et al.* (1998) avaliou a capacidade da papaína e de outras enzimas proteolíticas tais como tripsina, quimotripsina e bromelina em atravessar a barreira epitelial e verificaram que mesmo em baixas concentrações, a papaína pode provocar uma diminuição significativa dos valores de RET da monocamada de células Caco-2 por meio da abertura das junções oclusivas, facilitando o transporte paracelular de compostos que possuem uma baixa capacidade de permeação.

GUGGI; BERNKOP-SCHNÜRCH (2005) também demonstrou que a papaína possui a capacidade de promover a permeação de compostos de baixo e alto peso molecular através da mucosa do intestino delgado.

GRABOVAC *et al.* (2007) desenvolveram comprimidos contendo heparina de baixo peso molecular associada a papaína e exploraram a propriedade proteolítica da papaína visando aumentar a permeação de biomoléculas no decorrer do trato gastrointestinal de ratos e observaram que houve um aumento significativo da biodisponibilidade da heparina em comparação ao grupo controle.

A ROD123 é capaz de atravessar facilmente a membrana celular devido a sua natureza lipofílica e pode acumular-se nas mitocôndrias (FORSTER *et al.*, 2012). Entretanto, ela é substrato específico da P-gp, o que pode dificultar a sua capacidade em atravessar a membrana celular (SHAPIRO; LING, 1997).

A curva analítica utilizada para a quantificação desse marcador está presente na Figura 9.

Esse marcador foi usado para avaliar a função da P-gp presente na monocamada de células Caco-2 através da avaliação de seu transporte bidirecional do compartimento apical

para o compartimento basolateral e vice-versa. A taxa de efluxo foi de $0,2 \pm 0,02$ indicando a presença funcional da P-gp na membrana celular apical.

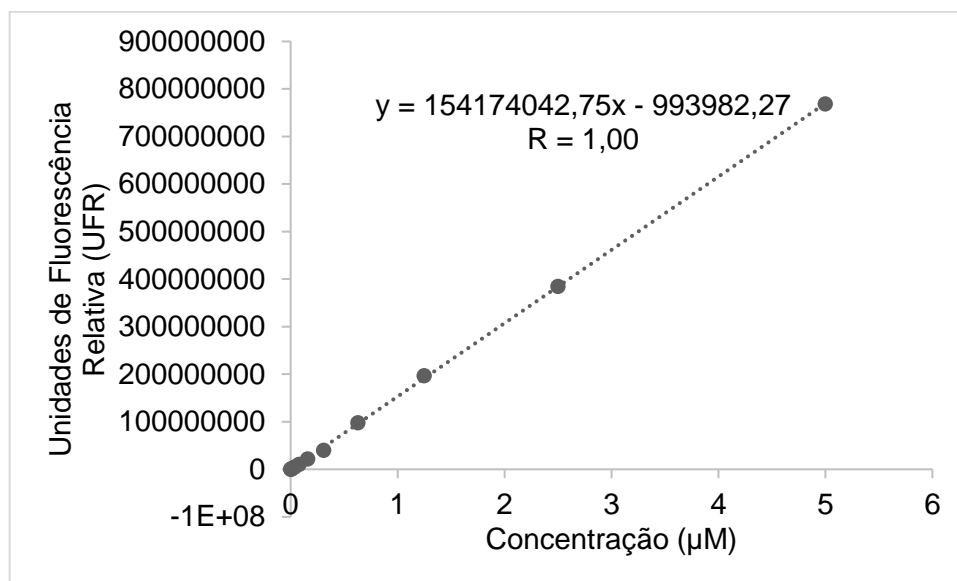


Figura 9. Curva analítica da rodamina 123.

O LY foi utilizado como marcador da integridade paracelular na monocamada de células Caco-2. Esse composto fluorescente possui valores de coeficiente de permeabilidade muito baixos, uma vez que permeia somente através da via paracelular (PRESS; DI GRANDI, 2008).

A curva analítica utilizada para a quantificação desse marcador está presente na Figura 10.

A P_{app} foi de $4,3 \times 10^{-7} \text{ cm.s}^{-1}$. Segundo WANG *et al.* (2009), valores de P_{app} menores que $5 \times 10^{-7} \text{ cm.s}^{-1}$ indicam que houve a manutenção da integridade da monocamada de células ao longo do ensaio de permeabilidade.

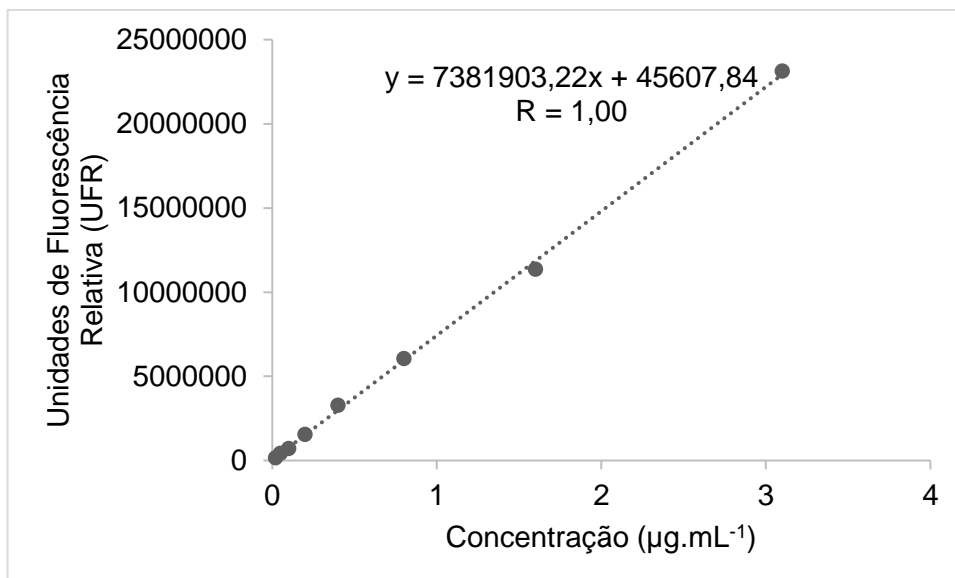


Figura 10. Curva analítica do *Lucifer Yellow*.

4.4 Microscopia de fluorescência confocal

As imagens obtidas por microscopia de fluorescência confocal, utilizando Alexa Fluor™ 488 Faloidina para marcar os filamentos de actina presentes no citoesqueleto das células e DAPI para coloração de material genético, possibilitaram a visualização direta da monocamada e da rede de junções oclusivas formada, assegurando assim a obtenção da morfologia adequada (Figura 11).

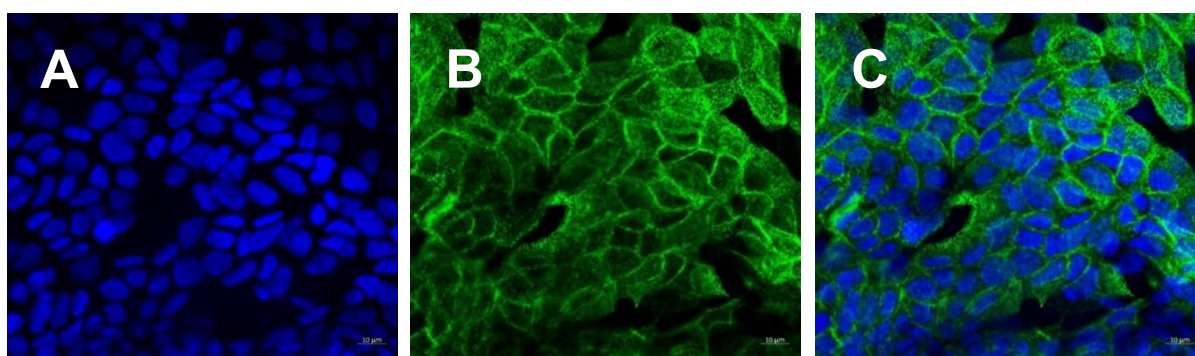


Figura 11. Microscopia de fluorescência confocal de uma monocamada de células Caco-2 sobre insertores do Transwell® cultivadas por 21 dias. **A.** DAPI - azul, marcando núcleos celulares; **B.** Alexa Fluor™ 488 Faloidina - verde, marcando filamentos de actina presentes preferencialmente nas bordas celulares e microvilosidades. **C.** Sobreposição de todas as marcações (*Merged*). Aumento de 63X com óleo de imersão.

5. Conclusão

As amostras de papaína livre e complexada com β -ciclodextrina e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina apresentaram uma toxicidade dose-dependente sobre as células Caco-2, entretanto, a baixa viabilidade celular é decorrente de sua atividade proteolítica capaz de desaderir as células e não por promover a necrose celular em concentrações elevadas. Além disso, mesmo em baixas concentrações, esses compostos foram capazes de favorecer a permeabilidade paracelular da furosemida. Os resultados apresentados sugerem que além dos complexos contendo papaína poderiam ser utilizados como agentes terapêuticos no tratamento de patologias colônicas, eles também poderiam ser empregados como adjuvantes farmacotécnicos na promoção de permeação de fármacos que apresentam baixa permeabilidade oral.

6. Agradecimentos

A Gabriela Nemésio Fazolin, do Centro de Química e Meio Ambiente do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares pelo suporte fornecido. A Sheila Schuindt do Carmo e ao Waldir Caldeira, do Centro de Aquisição de Imagens e Microscopia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo pela aquisição das imagens de microscopia de fluorescência confocal. A Rose Eli Grassi Rici, do Centro Avançado em Diagnóstico por Imagem da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo pela aquisição das imagens de microscopia eletrônica de varredura. A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de bolsa (processo FAPESP n. 2015/19212-3) e pelo financiamento do projeto (processo FAPESP n. 2015/19213-0).

7. Referências

- ABUHELWA, A.Y. *et al.* Food, gastrointestinal pH, and models of oral drug absorption. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.112, p.234-48, 2016.
- AMIDON, G.L. *et al.* A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability **Pharm. Res.**, v.12, p.413-20, 1995.
- ARTURSSON, P.; KARLSSON, J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.175, n.3, p.880-5, 1991.
- AVDEEF, A.; TAM, K.Y. How well can the Caco-2/Madin-Darby Canine Kidney models predict effective human jejunal permeability? **J. Med. Chem.**, v.53, p.3566-84, 2010.
- AZEVEDO, F.F. *et al.* Evaluating the effect of 3% papain gel application in cutaneous wound healing in mice. **Wounds**, v.29, n.4, p.96-101, 2017.

BALIMANE, P.V.; CHONG, S.; MORRISON, R.A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. **J. Pharmacol. Toxicol.**, v.44, p.301-12, 2000.

BENET, L.Z.; CUMMINS, C.L.; WU, C.Y. Unmasking the dynamic interplay between efflux transporters and metabolic enzymes. **Int. J. Pharm.**, v.277, n.1-2, p.3-9, 2004.

BOCK, U. *et al.* Transport of proteolytic enzymes across caco-2 cell monolayers. **Pharm. Res.**, v.15, p.1393-1400, 1998.

BRASIL. Resolução RDC n° 166, de 24 de julho de 2017. **“Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências”**. Órgão emissor: ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

CANO-CEBRIÁN, M.J. *et al.* Intestinal absorption enhancement via the paracellular route by fatty acids, chitosans and others: a target for drug delivery. **Curr. Drug Deliv.**, v.2, p.9-22, 2005.

CHENG, K.C.; LI, C.; USS, A.S. Prediction of oral drug absorption in humans from cultured cell lines and experimental animals. **Expert Opin. Drug. Metab. Toxicol.**, v.4, n.5, p.581-90, 2008.

COLLARD, E.; ROY, S. Improved function of diabetic wound-site macrophages and accelerated wound closure in response to oral supplementation of a fermented papaya preparation. **Antioxid. Redox Signal.**, v.13, n.5, p.599-606, 2010.

DALET-FUMERON V.; BOUDJENNAH, L.; PAGANO, M. Binding of the cysteine proteinases papain and cathepsin B-like to coated laminin: use of synthetic peptides from laminin and from the laminin binding region of the beta 1 integrin subunit to characterize the binding site. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.358, n.2, p.283-90, 1998.

DAVIS, M.E.; BREWSTER, M.E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. **Nat. Rev. Drug Discovery**, v.3, n.12, p.1023-35, 2004.

DEL VALLE, E.M.M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochem.**, v.39, p.1033-46, 2004.

DUTRA, J.A. *et al.* Papain wound dressings obtained from poly(vinyl alcohol)/calcium alginate blends as new pharmaceutical dosage form: preparation and preliminary evaluation. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.113, p.11-23, 2017.

FERRAZ, C.C. *et al.* Validation of *in vitro* analytical method to measure papain activity in pharmaceutical formulations. **Int. J. Pharm. Pharm. Sci.**, v.6, n.2, p.658-61, 2014.

FERNANDES, M.B. Caco-2 cells permeability evaluation of nifuroxazide derivatives with potential activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v.41, n.7, p.1-7, 2015.

FLINDT, M.L. Allergy to alpha-amylase and papain. **Lancet**, v.1, n.8131, p.1407-8, 1979.

FORSTER, S. *et al.* Characterization of rhodamine-123 as a tracer dye for use in *in vitro* drug transport assays. **Plos One**, v.7, n.3, p. 1-9, 2012.

FRISCH, S.M.; SCREATON, R.A. Anoikis mechanisms. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v.13, n.5, p.555-62, 2001.

GONÇALVES, J.E. *et al.* Effect of pH, mucin and bovine serum on rifampicin permeability through Caco-2 cells. **Biopharm. Drug Dispos.**, v.33, n.6, p.316-23, 2012.

GRABOVAC, V. *et al.* A. Papain: an effective permeation enhancer for orally administered low molecular weight heparin. **Pharm. Res.**, v.24, n.5, p.1001-6, 2007.

GRANERO, G.E. *et al.* Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: furosemide. **J. Pharm. Sci.**, v.99, n.6, p.2544-56, 2010.

GUGGI, D.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Improved paracellular uptake by the combination of different types of permeation enhancers. **Int. J. Pharm.**, v.288, n.6, p.141-50, 2005.

GUMBINER, B.M. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. **Cell**, v.84, p.345-57, 1996.

HUI, W. *et al.* Evaluation of cholesterol depletion as a marker of nephrotoxicity *in vitro* for novel β -cyclodextrin derivatives. **Food Chem. Toxicol.**, v.49, n.6, p.1387-93, 2011.

INGELS, F. *et al.* Simulated intestinal fluid as transport medium in the Caco-2 cell culture model. **Int. J. Pharm.**, v.232, p.183-92, 2002.

IRIE, T.; UEKAMA, K. Pharmaceutical applications of cyclodextrins III. Toxicological issues and safety evaluation. **J. Pharm.Sci.**, v.86, n.2, p.147-62, 1997.

JUNG, Y.; KIM, Y.M. What should be considered on design of a colon-specific prodrug? **Expert Opin. Drug Deliv.**, v.7, n.2, p.245-58, 2010.

KARASOV, W.H. Integrative physiology of transcellular and paracellular intestinal absorption. **J. Exp. Biol.**, v.220, p.2495-2501, 2017.

KISS, T. *et al.* Evaluation of the cytotoxicity of β -cyclodextrin derivatives: evidence for the role of cholesterol extraction. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v.40, p.376-80, 2010.

KRATZ, J.M. *et al.* An HPLC-UV method for the measurement of permeability of marker drugs in the Caco-2 cell assay. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.44, n.6, p.531-7, 2011.

KUMAR, P.; MISHRA, B. Colon targeted drug delivery systems -an overview. **Curr. Drug Deliv.**, v.5, n.3, p.186-98, 2008.

KURKOV, S.V.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins. **Int. J. Pharm.**, v.453, p.167-80, 2013.

LEE, J.B. *et al.* A novel *in vitro* permeability assay using three-dimensional cell culture system. **J. Biochem.**, v.205, p.93-100, 2015.

LEE, J.H. *et al.* ZOT-derived peptide and chitosan functionalized nanocarrier for oral delivery of protein drug. **Biomaterials**, v.103, p.160-9, 2016.

LENNERNÄS, H. Human intestinal permeability. **J. Pharm. Sci.**, v.87, n.4, p.403-10, 1998.

LEROY-LECHAT, F. *et al.* Evaluation of the cytotoxicity of cyclodextrins and hydroxypropylated derivatives. **Int. J. Pharm.**, v.101, n.1-2, p.97-103, 1994.

LI, C. *et al.* Development of *in vitro* pharmacokinetic screens using Caco-2, human hepatocyte, and Caco-2/human hepatocyte hybrid systems for the prediction of oral bioavailability in humans. **J. Biomol. Screen.**, v.12, p.1084-91, 2007.

LINDENBERG, M.; KOPP, S.; DRESSMAN, J.B. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.58, n.2, p.265-78, 2004.

LOPES, P.S. *et al.* Evaluation of *in vitro* percutaneous enhancement effect of papain and pequi oil on diclofenac sodium permeation through human skin. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 44, n. 2, p. 225-231, 2008a.

LOPES, P.S. *et al.* In vitro safety assessment of papain on human skin: A qualitative Light and Transmission Electron Microscopy (TEM) study. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v.44, n.1, p.151-6, 2008b.

LUNDQUIST, P.; ARTURSSON, P. Oral absorption of peptides and nanoparticles across the human intestine: Opportunities, limitations and studies in human tissues. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.106, n. Pt B, p.256-76, 2016.

MAES, M. *et al.* Measurement of apoptotic and necrotic cell death in primary hepatocyte cultures. **Methods Mol. Biol.**, v.1250, p.349-61, 2015.

MAHER, S.; MRSNY, R.J.; BRAYDEN, D.J. Intestinal permeation enhancers for oral peptide delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, .106, p.277-319, 2016.

MARSOUSI, N. *et al.* Intestinal permeability and P-glycoprotein-mediated efflux transport of ticagrelor in Caco-2 monolayer cells. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, v.30, p.577-84, 2016.

MCCARTNEY, F.; GLEESON, J.P.; BRAYDEN, D.J. Safety concerns over the use of intestinal permeation enhancers: a mini-review. **Tissue barriers**, v.4, n.2, p. e1176822-2-13, 2016.

MONETTA, L. Uso da papaína nos curativos feitos pela enfermagem. **Rev. Bras. Enferm.**, v.40, n.1, p.66-73, 1987.

MÜLLER, A. *et al.* Comparative study of antitumor effects of bromelain and papain in human cholangiocarcinoma cell lines. **Int. J. Oncol.**, v.48, p.2025-34, 2016.

NATOLI, M. *et al.* Good Caco-2 cell culture practices. **Toxicol. In Vitro**, v.26, n.8, p.1243-6, 2012.

ÖLANDER, M. *et al.* The proteome of filter-grown Caco-2 cells with a focus on proteins involved in drug disposition. **J. Pharm. Sci.**, v.105, n.2, p.817-27, 2016.

OLTRA-NOGUERA, D. *et al.* Variability of permeability estimation from different protocols of subculture and transport experiments in cell monolayers. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods**, v.71, p.21-31, 2015.

PHAM-THE, H. *et al.* Provisional Classification and *in silico* study of biopharmaceutical system based on Caco-2 cell permeability and dose number. **Mol. Pharm.**, v.10, n.6, p.2445-61, 2013.

PRESS, B.; DI GRANDI, D. Permeability for intestinal absorption: Caco-2 assay and related issues. **Curr. Drug Metab.**, v.9, n.9, p.893-900, 2008.

RENUKUNTLA, J. *et al.* Approaches for enhancing oral bioavailability of peptides and proteins. **Int. J. Pharm.**, v.447, p.75-93, 2013.

SADEGHI, A.M.M. *et al.* Permeation enhancer effect of chitosan and chitosan derivatives: comparison of formulations as soluble polymers and nanoparticulate systems on insulin absorption in Caco-2 cells. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.70, p.270-8, 2008.

SHAPIRO, A.B.; LING, V. Positively cooperative sites for drug transport by P-glycoprotein with distinct drug specificities. **Eur. J. Biochem.**, v.250, n.1, p.130-7, 1997.

SHI, L. *et al.* Study on the debridement efficacy of formulated enzymatic wound debriding agents by *in vitro* assessment using artificial wound eschar and by an *in vivo* pig model. **Wound Repair Regen.**, v. 17, p.853-62, 2009.

SHIMPI, S.; CHAUHAN, B.; SHIMPI, P. Cyclodextrins: application in different routes of drug administration. **Acta Pharm.**, v.55, n.2, p.139-56, 2005.

SILVA JR, Z.S. *et al.* Papain gel containing methylene blue for simultaneous caries removal and antimicrobial photoinactivation against *Streptococcus mutans* biofilms. **Sci Rep.**, v.6, p.1-12, 2016.

SINGH, D.; SINGH, R. Papain incorporated chitin dressings for wound debridement sterilized by gamma radiation. **Radiat. Phys. Chem.**, v.81, n.11, p.1781-5, 2012.

SKOLNIK, S. *et al.* Towards prediction of *in vivo* intestinal absorption using a 96-well Caco-2 assay. **J. Pharm. Sci.**, v.99, p.3246-65, 2010.

SOUZA, J.; FREITAS, Z.M.F.; STORPIRTIS, S. Modelos *in vitro* para determinação da absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/absorção. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v.43, n.4, p.515-27, 2007.

STELLA, V.J.; HE, Q. Cyclodextrins. **Toxicol. Pathol.**, v.36, p.30-42, 2008.

SUGANO, K. *et al.* Coexistence of passive and carrier-mediated processes in drug transport. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v.9, n.8, p.597-614, 2010.

THOMPSON, D. O. Cyclodextrins - enabling excipients: their present and future use in pharmaceuticals. **Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.**, v.14, p.1-104, 1997.

UEKAMA, K.; HIRAYAMA, F.; IRIE, T. Cyclodextrin drug carrier systems. **Chem. Rev.**, v.98, n.5, p.2045-76, 1998.

UNGELL, A.L. *et al.* Membrane transport of drugs in different regions of the intestinal tract of the rat. **J. Pharm. Sci.**, v.87, n.3, p.360-6, 1997.

VARCA, G.H.C. *et al.* Cyclodextrins: an overview of the complexation of pharmaceutical proteins. **Curr. Protein Pept. Sci.**, v.11, n.4, p.255-63, 2010.

VARCA, G.H.C. *et al.* Thermal characterization and cytotoxicity of complexes formed by papain and cyclodextrin. **J. Biol. Phys.**, v.33, p.463-75, 2007.

- VIEIRA, A.C. *et al.* Diclofenac- β -cyclodextrin for colonic drug targeting: *In vivo* performance in rats. **Int. J. Pharm.**, v.500, n.1-2, p.366-70, 2016.
- WANG, X.D. *et al.* Permeation of astilbin and taxifolin in Caco-2 cell and their effects on the P-gp. **Int. J. Pharm.**, v.378, p.1-8, 2009.
- YEE, S. *In vitro* permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict *in vivo* (small intestinal) absorption in man-fact or myth. **Pharm. Res.**, v.14, n.6, p.763-6, 1997.
- YEWALE, C. *et al.* Oral Absorption promoters: opportunities, issues, and challenges. **Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.**, v.32, n.5, p.363-87, 2015.
- ZULLI, G. *et al.* Influence of gamma radiation onto polymeric matrix with papain. **Radiat. Phys. Chem.**, v.79, p.286-8, 2010.

**Capítulo 3 – Avaliação permeabilidade da
furosemida através da tripla co-cultura de células
Caco-2, HT29-MTX e Raji**

Resumo

A papaína é uma fitoenzima utilizada na terapêutica para o tratamento de feridas e também pode ser empregada como promotora de permeação de diversos ativos. O objetivo desse trabalho foi avaliar a citotoxicidade e a capacidade das amostras contendo papaína livre e complexada e complexada com β -ciclodextrina e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina e de minicomprimidos de papaína livre em promover a permeação da furosemida através do modelo biomimético de tripla co-cultura de células Caco-2, HT29-MTX e Raji. A viabilidade celular foi avaliada pela conversão mitocondrial do MTT e Presto Blue® empregando-se diferentes concentrações das amostras. A permeabilidade aparente (P_{app}) da furosemida e do metoprolol pode ser calculada após quantificação desses marcadores por HPLC. A integridade da monocamada foi verificada pela RET (Resistência Elétrica Transepitelial) e também pelo *Lucifer Yellow* (LY). A presença da glicoproteína-P (P-gp) foi avaliada mediante o efluxo da rodamina 123 (ROD123). As amostras contendo papaína apresentaram baixa citotoxicidade, sendo um bom indicativo de que houve a manutenção da integridade bioquímica mitocondrial nas menores concentrações utilizadas. A P_{app} da furosemida foi de $0,6 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$ e em média de $0,8 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$ na presença das amostras de papaína complexada com ciclodextrinas. O metoprolol apresentou P_{app} de $7,1 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$. A papaína possui a capacidade proteolítica da papaína em dilatar as junções oclusivas presentes entre as células adjacentes da monocamada e isso pode ter favorecido a permeação da furosemida. O efluxo da ROD123 foi de 0,1 e a P_{app} do LY foi de $3,8 \times 10^{-7} \text{ cm.s}^{-1}$, indicando a presença de P-gp e a manutenção da integridade paracelular da monocamada de células. Os resultados apresentados sugerem que as amostras de papaína complexada com ciclodextrinas poderiam ser empregadas como adjuvantes terapêuticos na promoção de permeação de fármacos que apresentam baixa permeabilidade oral.

Palavras chave: enzimas proteolíticas; citotoxicidade; barreira intestinal *in vitro*; co-cultura; muco.

1.Introdução

O trato gastrointestinal (TGI) é coberto por uma monocamada de células epiteliais. A maioria dessas células estão envolvidas em diferentes tarefas, dependendo de sua localização ao longo do TGI. Os enterócitos do intestino são células colunares que possuem uma superfície apical especializada contendo microvilosidades e são responsáveis principalmente pela digestão final e absorção de nutrientes e também de fármacos (PAULETTI *et al.*, 1996).

Os enterócitos são intercalados por células caliciformes (ou células de Goblet) que mostram uma prevalência aumentada ao longo do TGI. As células caliciformes também são células polarizadas que apresentam grânulos para secreção de muco e são encontradas no estômago e em maiores quantidades, no íleo e no cólon (KIM; HO, 2010).

O muco é uma secreção espessa constituída principalmente por água e glicoproteínas estabilizado por ligações dissulfeto e apresenta características de hidrogel. Sua principal função é formar uma barreira física protetora entre o lúmen e o epitélio, protegendo-o do peristaltismo e da ação de micro-organismos, além de auxiliar na lubrificação do TGI (JOHANSSON; LARSSON; HANSSON, 2011). Dentre as diversas glicoproteínas produzidas, a mucina do tipo 2 (MUC2) é a principal constituinte do muco presente no intestino (RODRÍGUEZ-PIÑEIRO *et al.*, 2013).

Além dos enterócitos e das células caliciformes, o epitélio intestinal também é composta por outras populações celulares, destacando-se as células M (*Microfold*). As células M são células epiteliais especializadas que recobrem os folículos linfoides das placas de Peyer, encontradas na região do íleo do intestino delgado. Na parte apical, essas células possuem microvilosidades mais espaçadas e em menor número comparada aos enterócitos; na parte basolateral, essas células são caracterizadas por numerosas invaginações basais que contêm muitos linfócitos e células apresentadoras de antígenos, como macrófagos (SAKHON *et al.*, 2015).

A administração de medicamentos pela via oral é preferencialmente a mais utilizada por ser muito conveniente e acessível além de apresentar diversas vantagens terapêuticas principalmente por ser de fácil administração e indolor e também por auxiliar a terapia crônica de diversas patologias locais e sistêmicas melhorando a adesão terapêutica do paciente (ABUHELWA *et al.*, 2011; DATE; HANES; ENSIGN, 2016; MOELLER; JORGENSEN, 2008).

Após a administração oral, o fármaco deve ser capaz de atravessar a barreira intestinal e atingir a circulação sistêmica, entretanto, a absorção oral de fármacos é um processo influenciado pelas características físico-químicas dessas moléculas, tais como, forma cristalina, solubilidade, pH, peso molecular, lipofilicidade e capacidade de dissolução além de fatores fisiológicos dentre eles, o tempo de esvaziamento gástrico, a presença de sais biliares, a motilidade intestinal, as características hidrodinâmicas e a permeabilidade epitelial, que

podem também influenciar a biodisponibilidade e consequentemente o efeito terapêutico desejado (MUDIE; AMIDON; AMIDON, 2010).

Segundo ISSA; FERRAZ (2011), a dissolução do fármaco nos fluidos biológicos e a permeação através do epitélio gastrintestinal são etapas fundamentais para que ocorra a liberação e a absorção do fármaco administrado por via oral.

A permeabilidade intestinal de um fármaco refere-se a sua capacidade em atravessar a barreira epitelial. De acordo com a FDA (2017), a permeabilidade é um processo dinâmico baseado indiretamente na extensão da absorção de um fármaco (fração da dose absorvida) e de modo direto, por meio da taxa de transferência de massa através da membrana intestinal humana. Além do mais, considera-se que, um fármaco apresenta alta permeabilidade quando sua biodisponibilidade absoluta for maior do que 85%.

Atualmente, existem diferentes modelos que podem ser utilizados para previsão de absorção oral de fármacos em humanos e também para a classificação de fármacos de acordo com a sua permeabilidade. Tais modelos incluem membranas artificiais e culturas celulares *in vitro* (PAMPA e Caco-2), estudos de perfusão intestinal (métodos *in situ*) e estudos *ex vivo* utilizando segmentos intestinais de animais ou humanos (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; SOUZA; FREITAS; STORPIRTIS, 2007; LOZOYA-AGULLO *et al.*, 2015).

Os ensaios de permeabilidade *in vitro* como PAMPA (ensaio de permeabilidade de membrana artificial paralela) e culturas de células, como Caco-2 (células provenientes de um adenocarcinoma de cólon humano carcinoma do cólon humano) são considerados testes simples e fundamentais durante a descoberta e o desenvolvimento de novos fármacos (KERNS *et al.*, 2004).

As células Caco-2 são capazes de diferenciar-se em enterócitos, formando uma monocamada homogênea de células polarizadas com microvilosidades na borda apical aderidas por complexos juncionais além da expressarem enzimas em suas microvilosidades e carreadores específicos para vitaminas e aminoácidos, mantendo as características morfológicas e funcionais das células epiteliais intestinais (ARTURSSON; PALM; LUTHMAN, 2001).

Se por um lado as células Caco-2 são consideradas um excelente modelo para avaliação da permeabilidade *in vitro*, por outro lado, o emprego desse modelo não simula a composição ideal da camada epitelial fisiológica tendo em vista que a monocamada de células Caco-2 apresenta somente um tipo de células e não contém os outros vários tipos celulares dentre elas, células caliciformes e células M, sendo que os enterócitos e as células caliciformes representam as maiores populações observados no epitélio intestinal (WALTER *et al.*, 1996).

Com o intuito de melhorar o desempenho e mimetizar as condições de barreira intestinal, diversos estudos mostram que as células Caco-2 podem ser co-cultivadas com

células HT29-MTX produtoras de muco e também com células Raji que vão estimular a diferenciação das células Caco-2 em células M. Assim, o co-cultivo dessas linhagens pode fornecer condições mais fisiológicas tornando o modelo de avaliação da permeabilidade *in vitro* de fármacos e candidatos a fármacos mais compatível com o modelo *in vivo* (ARAÚJO *et al.*, 2016; CIAPPELLANO *et al.*, 2016; SCHIMPEL *et al.*, 2014).

2. Objetivos

2.1 Geral

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a capacidade da papaína livre e complexada com ciclodextrinas em promover a permeação de um fármaco de baixa permeabilidade através da tripla co-cultura de células Caco-2, HT29-MTX e Raji.

2.2 Específicos

- Avaliar da citotoxicidade da papaína livre e complexada com β -ciclodextrina e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina pela conversão do MTT empregando as linhagens celulares Caco-2, HT29-MTX e na co-cultura de células Caco-2 e HT29-MTX;
- Avaliar da citotoxicidade da papaína livre e complexada com β -ciclodextrina e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina mediante a utilização do Presto Blue® empregando a linhagem de células Raji;
- Quantificar a permeabilidade da furosemida através da da tripla co-cultura de células Caco-2, HT29-MTX e Raji.

3, Materiais e métodos

3.1 Produção dos minicomprimidos de papaína livre

A produção dos minicomprimidos foi realizada em parceria com o aluno de Mestrado Felipe Nambu e com o Prof. Dr. Newton Andréo-Filho, do Laboratório Farmacotécnica e Cosmetologia (processo FAPESP n. 2016/22916-5).

Inicialmente as matérias-primas foram submetidas à calibração em tamis com abertura de malha de 425 μ m, em seguida foram misturados em saco plástico. As matérias-primas utilizadas encontram-se descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Composição dos minicomprimidos de papaína livre.

Matéria-prima	Composição (%)
Celulose microcristalina (Microcel [®] MC -102, Blanver)	43%
Amido pré-gelatinizado (Starch 1500 [®] , Colorcon [®])	43%
Polivinilpirrolidona (Kollidon [®] CL, BASF)	1%
Estearato de magnésio (Labsynth [®])	1,5%
Dióxido de silício coloidal (Aerosil [®] 200 Pharma, Evonik [®])	1,5%
Papaína livre grau farmacêutico (30.000 USP-U.mg ⁻¹) (Merck [®])	10%

Os minicomprimidos foram produzidos por compressão direta (compressora rotativa modelo Mini Express LM 8, Lemaq) utilizando 4 punções e matrizes de 2 mm de diâmetro. A compressora rotativa operou na velocidade de 42,5 minicomprimidos/minuto.

Posteriormente, foram realizados ensaios de caracterização físico-química e estudos de dissolução.

3.2 Ensaio de dissolução de minicomprimidos de papaína livre

Para a realização dos ensaios de dissolução, 40 minicomprimidos foram transferidos para uma cuba contendo 500 mL de meio de dissolução (tampão de fosfato de sódio pH 6,8), mimetizando *in vitro* uma condição de liberação entérica. Esses ensaios foram conduzidos utilizando-se o aparato 2 (pá) no equipamento de dissolução (modelo 299-6TS, Nova Ética) com velocidade de rotação 50 rpm a 37°C por 60 minutos.

Posteriormente, após esse intervalo de tempo, uma alíquota do meio de dissolução foi coletada para a realização da avaliação da atividade enzimática, conforme descrito no item 3.2 do Capítulo 1. Outras alíquotas também foram coletadas para a realização do ensaio de permeabilidade.

3.3 Cultura celular

As células de adesão Caco-2 (linhagem de células adenocarcinoma de cólon humano) (ATCC[®] HTB-37[™]) e HT29-MTX (linhagem de células calciformes maduras após o tratamento com metotrexato provenientes de adenocarcinoma de cólon humano) (ECACC HT29-MTX-E12 12040401) foram cultivadas, separadamente, em meio DMEM (*Dubelcco's Modified Eagle's Medium*) alta glicose (Vitrocell[®]) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (Vitrocell[®]), 1% (v/v) de L-Glutamina (Vitrocell[®]) e 1% (v/v) de solução de antibióticos (10.000 UI.mL⁻¹ de penicilina, 10 mg.mL⁻¹ de estreptomicina e 1 mg.mL⁻¹ de anfotericina B) (Vitrocell[®]).

As células de suspensão Raji (linhagem de células B linfoblásticas provenientes de linfoma de Burkitt) (ATCC® CCL-86™) foram cultivadas em meio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute* (Vitrocell®) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (Vitrocell®), 1% (v/v) de solução 200 mM de L-Glutamina (Vitrocell®) e 1 % (v/v) de solução de antibióticos contendo 10.000 UI.mL⁻¹ de penicilina, 10 mg.mL⁻¹ de estreptomicina e 1 mg.mL⁻¹ de anfotericina B (Vitrocell®).

As células foram incubadas em estufa a 37°C a 5% de CO₂ com umidade controlada (Thermo Scientific™, modelo 3425). O processo de descolamento celular ocorreu pela ação da solução de tripsina (2,5 g.L⁻¹) e EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético (0,38 g.L⁻¹) (Vitrocell®). Cada tripsinização foi registrada como uma passagem e os ensaios ocorreram a partir da segunda passagem.

3.4 Ensaio de citotoxicidade

3.4.1 Células Caco-2 e HT29-MTX

Inicialmente, foram semeadas separadamente 15.10³ células Caco-2, HT29-MTX em 100 µL de meio de cultura em microplacas de 96 poços, seguindo a metodologia descrita no item 3.4 do Capítulo 1.

3.4.2 Células Raji

Inicialmente, foram semeadas 15.10³ células Raji em 90 µL de meio de cultura em microplacas de 96 poços contendo uma diluição seriada em sextuplicata das soluções das amostras recém-preparadas sendo que a concentração variou entre 0,7 e 85,7 µM o que corresponde a 0,02 e 2 mg.mL⁻¹, respectivamente, para as amostras contendo papaína (PPN), papaína complexada com β-ciclodextrina (PPN-β-CD) e papaína complexada com 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (PPN-HP-β-CD), 8 e 969 µM, o que corresponde a 0,009 e 1,1 mg.mL⁻¹, respectivamente para as amostras de β-ciclodextrina e 7 e 929 µM, o que corresponde a 0,01 e 1,3 mg.mL⁻¹, respectivamente para as amostras de 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina. Como controle positivo, foi utilizado 1% (v/v) de Triton™ X-100 (Sigma-Aldrich®). Após a aplicação das amostras, as microplacas foram incubadas por 48 horas (OECD 129, 2010).

A viabilidade celular foi avaliada utilizando o reagente Presto Blue® (Invitrogen™). Esse reagente é uma solução pronta para uso contendo resazurina. Nas mitocôndrias de células viáveis, a resazurina, de cor azul e não fluorescente, é reduzida a resorufina, de cor rosa e fluorescente, e que não precipita após ser reduzida. A conversão é proporcional ao número de células metabolicamente ativas e pode ser avaliada quantitativamente usando medições de absorvâncias ou fluorescências, de acordo com o manual do fabricante (INVITROGEN™, 2012).

Após o período de incubação, foi adicionado 10 µL da solução de Presto Blue® em todos os poços e as microplacas foram incubadas por 2 horas. Em seguida, os valores de intensidade de fluorescência relativa foram medidos (excitação 570 nm; emissão 610 nm) utilizando o leitor de microplacas (modelo Synergy HT, Biotek®).

A viabilidade celular foi calculada de acordo com a equação: viabilidade celular (%) = (CT / CC) x 100, onde CT é a absorvância das células tratadas e CC é a absorvância do controle de células.

3.4.3 Co-cultura de células Caco-2 e HT29-MTX

Inicialmente, foram semeadas 20.10³ células Caco-2 e HT29-MTX na razão de 9:1 em 100 µL de meio de cultura em microplacas de 96 poços que foram incubadas por 24 horas para adesão das células.

Após 24 horas, os meios foram removidos e as células foram tratadas em sextuplicata com uma diluição seriada das soluções das amostras recém-preparadas sendo que a concentração variou entre 0,7 e 85,7 µM o que corresponde a 0,02 e 2 mg.mL⁻¹, respectivamente, para as amostras contendo papaína (PPN), papaína complexada com β-ciclodextrina (PPN-β-CD) e papaína complexada com 2-hidropropil-β-ciclodextrina (PPN-HP-β-CD), 8 e 969 µM, o que corresponde a 0,009 e 1,1 mg.mL⁻¹, respectivamente para as amostras de β-ciclodextrina e 7 e 929 µM, o que corresponde a 0,01 e 1,3 mg.mL⁻¹, respectivamente para as amostras de 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina. Como controle positivo, foi utilizado 1% (v/v) de Triton™ X-100 (Sigma-Aldrich®).

Após a aplicação das amostras, as microplacas foram incubadas sob agitação de 65 rpm por 2 horas. Em seguida, os meios foram removidos e substituídos por MTT em meio (0,5 mg.mL⁻¹) e as microplacas foram incubadas por 2 horas. Em seguida, os meios foram removidos e os poços foram gentilmente lavados com PBS.

Posteriormente, o sobrenadante foi removido e os cristais de formazan foram dissolvidos em 100 µL de isopropanol gelado sob agitação por 15 minutos ao abrigo da luz. Os valores de absorvâncias foram medidos no comprimento de onda de 570 nm utilizando o leitor de microplacas (modelo Synergy HT, Biotek®) (Adaptado de ANTUNES *et al.*, 2013).

A viabilidade celular foi calculada de acordo com a equação: viabilidade celular (%) = (CT / CC) x 100, onde CT é a absorvância das células tratadas e CC é a absorvância do controle de células.

3.5 Avaliação da permeabilidade da furosemida através da tripla co-cultura de células Caco-2, HT29-MTX e Raji

Inicialmente, foram semeadas 20.10³ células Caco-2 e HT29-MTX na proporção de 9:1 no compartimento doador do poço da Transwell® contendo 24 poços com suporte de

policarbonato de 0,4 μm de poro, e área de 0,33 cm^2 (Corning®). As células foram incubadas em estufa de CO_2 a 37°C com umidade controlada e os foram meio substituídos a cada 2 dias.

Após 14 dias, foram semeadas 30.10^3 células Raji no compartimento receptor (Adaptado de ANTUNES *et al.*, 2013).

Após 21 dias, os meios foram aspirados e substituídos pelo tampão de Hanks's contendo HEPES em pH 7,4 (Vitrocell®) e a placa foi incubada sob agitação de 65 rpm por 15 minutos para equilíbrio. Após esse período, a integridade das monocamadas de células foi avaliada por meio da resistência elétrica transepitelial (RET) que foi medida utilizando-se um voltímetro (Millicell® ERS-2, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) e foram considerados íntegras as monocamadas que apresentaram valores acima de 200 $\Omega.\text{cm}^2$ (HUBATSCH; RAGNARSSON; ARTURSSON, 2007).

O ensaio foi realizado com a adição das soluções das amostras recém-preparadas das amostras de papaína livre e complexada com β -ciclodextrina e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (0,7 μM) e de minicomprimidos de papaína livre concomitante à adição da solução de furosemida (Sigma-Aldrich®) ($100 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) ao compartimento apical para avaliar a capacidade dessas amostras em promover a permeação da furosemida, considerada um fármaco de baixa permeação (GRANERO *et al.*, 2010). Furosemida e metoprolol (Sigma-Aldrich®) ($100 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) foram utilizados como controles negativo e positivo, respectivamente. Os ensaios foram realizados unidirecionalmente do compartimento apical (doador - representando o lúmen intestinal) para o basolateral (receptor - representando a circulação sanguínea) a 37°C sob agitação de 65 rpm por 2 horas.

A quantificação da furosemida (pureza $\geq 98\%$) (Sigma-Aldrich®) e do metoprolol (pureza $\geq 98\%$) (Sigma-Aldrich®) foi realizada por HPLC (*High performance liquid chromatography*) (modelo LC-10A, Shimadzu Corporation) acoplado a um detector de fluorescência. Fase Móvel ($1 \text{ mL}.\text{min}^{-1}$): furosemida: tampão fosfato de potássio monobásico 20 mM pH 3,0 ajustado com ácido fosfórico e acetonitrila (J.T. Baker®) (70:30 (v/v)); metoprolol: tampão fosfato de potássio monobásico 20 mM pH 3,0, ajustado com ácido fosfórico e metanol (J.T. Baker®) (60:40 (v/v)). As soluções das amostras foram filtradas e analisadas à temperatura ambiente. Fase estacionária: coluna C18 de 150 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno, partícula de 5 μm . O comprimento de onda para a quantificação estabelecida foi de: furosemida λ_{ex} : 268 nm e λ_{em} : 410 nm; metoprolol: λ_{ex} : 230 nm e λ_{em} : 305 nm e o volume de injeção foi de 20 μL para cada amostra a ser quantificada (Adaptado de LOZOYA-AGULLO *et al.*, 2015).

As curvas de calibração de furosemida e metoprolol foram lineares ao longo do intervalo de concentrações utilizados ($10 - 250 \text{ ng}.\text{mL}^{-1}$ - $y = 11647x + 36003$, $R = 0,997$ para furosemida e $1 - 1000 \text{ ng}.\text{mL}^{-1}$ - $y = 7804,6x - 29594$, $R = 0,999$ para metoprolol), conforme descrito no item 3.5 do Capítulo 2.

A permeabilidade foi calculada plotando-se as concentrações acumuladas quantificadas nas amostras coletas *versus* o tempo de coleta, obtendo-se uma curva de concentração x tempo e sua respectiva inclinação. O coeficiente de permeabilidade aparente (P_{app}) (cm.s^{-1}) foi calculado de acordo com a equação: $P_{app} = V_R / (A \times C_0) \times dC/dT$, onde V_R é o volume do compartimento receptor, A é a área do suporte de cultivo das células, C_0 é a concentração inicial do fármaco adicionado no compartimento doador e dC/dT é a inclinação da curva de concentração *versus* tempo.

A permeabilidade paracelular foi avaliada mediante a quantificação do *Lucifer Yellow* (LY) (Invitrogen™) ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) do compartimento doador para o compartimento receptor. O transporte de LY foi estimado por fluorescência (λ_{ex} : 405 nm; λ_{em} : 535 nm) utilizando o leitor de microplacas (modelo SpectraMax® i3, Molecular Devices). A curva de calibração do LY foi linear ao longo do intervalo de concentração de 0.02 - $3,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($y = 7381903,22x + 45607,84$, $R = 1.00$).

A atividade da glicoproteína-P (P-gp), uma importante bomba de efluxo, foi avaliada por meio da quantificação da rodamina 123 (ROD123) (Sigma-Aldrich®) ($5 \mu\text{M}$) do compartimento doador (A) para o receptor (B) e vice-versa. A curva de calibração da ROD123 foi linear ao longo do intervalo de concentração de 0.002 - $5 \mu\text{M}$ ($y = 154174042,75x - 993982,27$, $R = 1.00$). A taxa de efluxo foi calculada de acordo com a fórmula: Taxa de efluxo = $P_{app} (B-A) / P_{app} (A-B)$. A concentração de ROD123 foi estimada por fluorescência (λ_{ex} : 485 nm; λ_{em} : 535 nm) utilizando o leitor de microplacas (modelo SpectraMax® i3, Molecular Devices).

3.6 Coloração do muco com *Alcian Blue*

Após 21 dias, as membranas contendo as células Caco-2 e HT29-MTX foram lavadas uma vez com tampão de Hanks's contendo HEPES em pH 7,4 (Vitrocell®) e as células foram fixadas com uma solução de Metacarn gelado (60% (v/v) metanol, 30% (v/v) clorofórmio e 10% (v/v) ácido acético glacial (Labsynth®)) por 15 minutos a 4°C. Em seguida, essa solução foi removida e as membranas foram lavadas uma vez com uma solução de ácido acético 3% (v/v).

Posteriormente, foi adicionada uma solução de *Alcian Blue* (Sigma-Aldrich®) 1% (m/v) em ácido acético 3% (v/v) que permaneceu em contato com as membranas por 15 minutos à temperatura ambiente. As membranas foram lavadas com PBS até a remoção completa do excesso de corante das membranas (Adaptado de BÉDUNEAU *et al.*, 2014).

3.7 Microscopia de fluorescência confocal

As marcações fluorescentes foram realizadas para visualização de determinados componentes das células Caco-2 e HT29-MTX por meio da coloração com Alexa Fluor™ 488

Faloidina (Thermo Fisher Scientific) para a marcação de filamentos de actina presentes no citoesqueleto e nas microvilosidades seguido de coloração por DAPI (4',6-*diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride*) (Sigma-Aldrich®) para marcação de núcleo. As soluções estoque dos corantes foram preparadas de acordo com as recomendações dos fabricantes.

Primeiramente, as membranas do Transwell® foram lavadas 2 vezes com PBS e fixadas com formaldeído (Thermo Fisher Scientific) 4% (v/v) em PBS por 10 minutos. Em seguida, as membranas foram lavadas 2 vezes com PBS e as células foram permeabilizadas com Triton™ X-100 (Sigma-Aldrich®) 0,2% (v/v) em PBS e incubadas por 7 minutos. Após esse período, as membranas foram lavadas 2 vezes com PBS e o bloqueio de ligações não específicas foi realizado com BSA (*Bovine Serum Albumin*) (Sigma Aldrich®) 1% (m/v) em PBS (PBS-BSA) por 30 minutos e as membranas foram lavadas mais 2 vezes com PBS.

Posteriormente, ao abrigo da luz, as células foram primeiramente marcadas com Alexa Fluor™ 488 Faloidina (diluição 1:40 em PBS-BSA), incubadas por 10 minutos e as membranas foram lavadas 2 vezes com PBS. Em seguida, as células foram marcadas com DAPI (1:10000 em PBS), incubadas por 10 minutos e as membranas foram lavadas 2 vezes com PBS. As lâminas foram montadas e as células foram visualizadas no microscópio de fluorescência confocal (Zeiss modelo LSM 880).

3.8 Microscopia eletrônica de varredura

Após 21 dias, as membranas foram lavadas uma vez com PBS e as células foram fixadas com uma solução de glutaraldeído (Sigma-Aldrich®) (2,5% (v/v) em PBS pH 7,4) e incubadas por 2 horas. Em seguida, as membranas foram lavadas 3 vezes com PBS, desidratadas em um gradiente de etanol (Sigma-Aldrich®), secas, utilizando o ponto crítico do CO₂ (secador de ponto crítico automático Leica Microsystems, modelo EM CPD300), coladas no suporte porta-amstras (*stub*) utilizando fita adesiva dupla face contendo carbono coloidal e recobertas com prata (Emitech modelo K550).

Posteriormente, as amostras foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (LEO Electron Microscopy Ltd. modelo 435 VP) (Adaptado de PASSEY; PELLEGRIN; MELLOR, 2007).

3.9 Análise estatística

Os ensaios foram realizados em duplicatas independentes e os resultados foram submetidos à análise *One-way* ANOVA e teste de Bonferroni para determinação de diferenças estatísticas entre os grupos de amostras ao nível de significância de 5% utilizando o programa *GraphPad Prism* versão 7,0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

4. Resultados e discussão

4.1 Ensaio de citotoxicidade

Os ensaios de avaliação da viabilidade celular desempenham um papel importante na caracterização do perfil toxicológico nos ensaios não clínicos iniciais de biomoléculas candidatas a fármacos. Células expostas a substâncias potencialmente tóxicas podem ter suas funções metabólicas vitais e comprometidas. Sendo assim, os testes de citotoxicidade *in vitro* são considerados uma ferramenta fundamental para a avaliação da integridade bioquímica e também para a detecção de lise e inibição do crescimento celular (GROOTHUIS *et al.*, 2015).

Para avaliação da toxicidade das amostras contendo papaína, foram empregados diferentes ensaios de citotoxicidade para verificar o possível efeito tóxico da papaína sobre a cadeia respiratória mitocondrial das células Caco-2, HT29-MTX, Raji e também da co-cultura de células Caco-2 e HT29-MTX expostas ou não às amostras de papaína livre e complexada com β -ciclodextrina e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina.

As amostras contendo papaína proporcionaram baixa citotoxicidade sobre a monocamada de células Caco-2, HT29-MTX durante o período de exposição de 48 horas nas menores concentrações, sendo indicativo que houve a manutenção da integridade bioquímica mitocondrial dessas células, sendo possível inclusive visualizar um perfil dose-dependente da concentração de papaína empregada (Figuras 1 e 2 e Tabela 2). Resultados semelhantes foram encontrados por VARCA *et al.*, 2007 e LOPES *et al.*, 2008.

A papaína é uma fitoenzima proteolítica muito utilizada na terapêutica para o tratamento de feridas devido a sua capacidade debridante em remover tecidos desvitalizados e também em estimular a cicatrização (COLLARD; ROY, 2010; MONETTA, 1987; TELGENHOFF *et al.*, 2007). Ela possui um efeito semelhante à ação da tripsina, ou seja, ela possui um mecanismo capaz de promover o descolamento de células e mediante a ação sobre proteínas transmembranares e moléculas de adesão juncionais responsáveis pela junção e adesão celular à matriz extracelular (AMRI; MAMBOYA, 2012).

De acordo com FRISCH; SCREATON (2001), as células aderentes são dependentes de ancoragem, ou seja, necessitam de adesão a uma superfície de contato para que possam iniciar a sua proliferação. A degradação dessas proteínas de adesão faz com que essas células percam o contato com a superfície da matriz extracelular e tornem-se incapazes de exercerem seu metabolismo, culminando na ativação de mecanismos de morte celular por perda de adesão - anoikis.

Esses resultados sugerem que a papaína possa ter agido sobre as junções celulares e proporcionado o descolamento das células aderidas o que levou à baixa viabilidade celular visualizada nas maiores concentrações das amostras empregadas.

Com base nos resultados de citotoxicidade empregando-se a monocamada de células Caco-2 e HT29-MTX isoladas, foram realizados os ensaios de citotoxicidade empregando a co-cultura dessas linhagens celulares. Segundo, ARAÚJO; SARMENTO (2013), as células Caco-2 assemelham-se a enterócitos que representam aproximadamente 90% do total células epiteliais do intestino e as células HT29-MTX podem mimetizar as células caliciformes produtoras muco e que representam aproximadamente 10% das células intestinais.

Nesse ensaio, as viabilidades celulares representadas nos valores de IC₅₀ foram ligeiramente maiores quando comparados aos valores obtidos das linhagens separadamente. Esses resultados também ilustram o comportamento dose-dependente da papaína, onde a papaína isolada gerou maior viabilidade celular nas menores concentrações testadas. Isso pode ter acontecido devido a produção de muco secretado pelas células HT29-MTX.

KÖLLNER *et al.* (2015) afirma que a papaína possui atividade mucolítica e o muco produzido pelas HT29-MTX poderia ser considerado um substrato para a papaína evitando que a enzima atingisse as proteínas de junção celular dessa monocamada de células.

Embora a atividade proteolítica da papaína tenha sido muito pronunciada sobre as células de adesão em concentrações mais elevadas, o mesmo comportamento não foi observado sobre as células Raji. Segundo EPSTEIN; BARR (1965) a linhagem Raji é constituída de células B linfoblásticas derivadas do linfoma de Burkitt caracterizadas por serem células de suspensão que não precisam estar aderidas à uma matriz para desempenharem suas atividades metabólicas. Sendo assim, a papaína não demonstrou atividade proteolítica sobre essas células, repercutindo na elevada viabilidade celular frente às diversas concentrações de papaína (Figura 3).

Isso pode corroborar o fato de que os compostos contendo papaína não são citotóxicas. Entretanto, a papaína por ter uma ação proteolítica em concentrações mais elevadas pode ocasionar a perda da integridade morfológica e à morte das células de adesão.

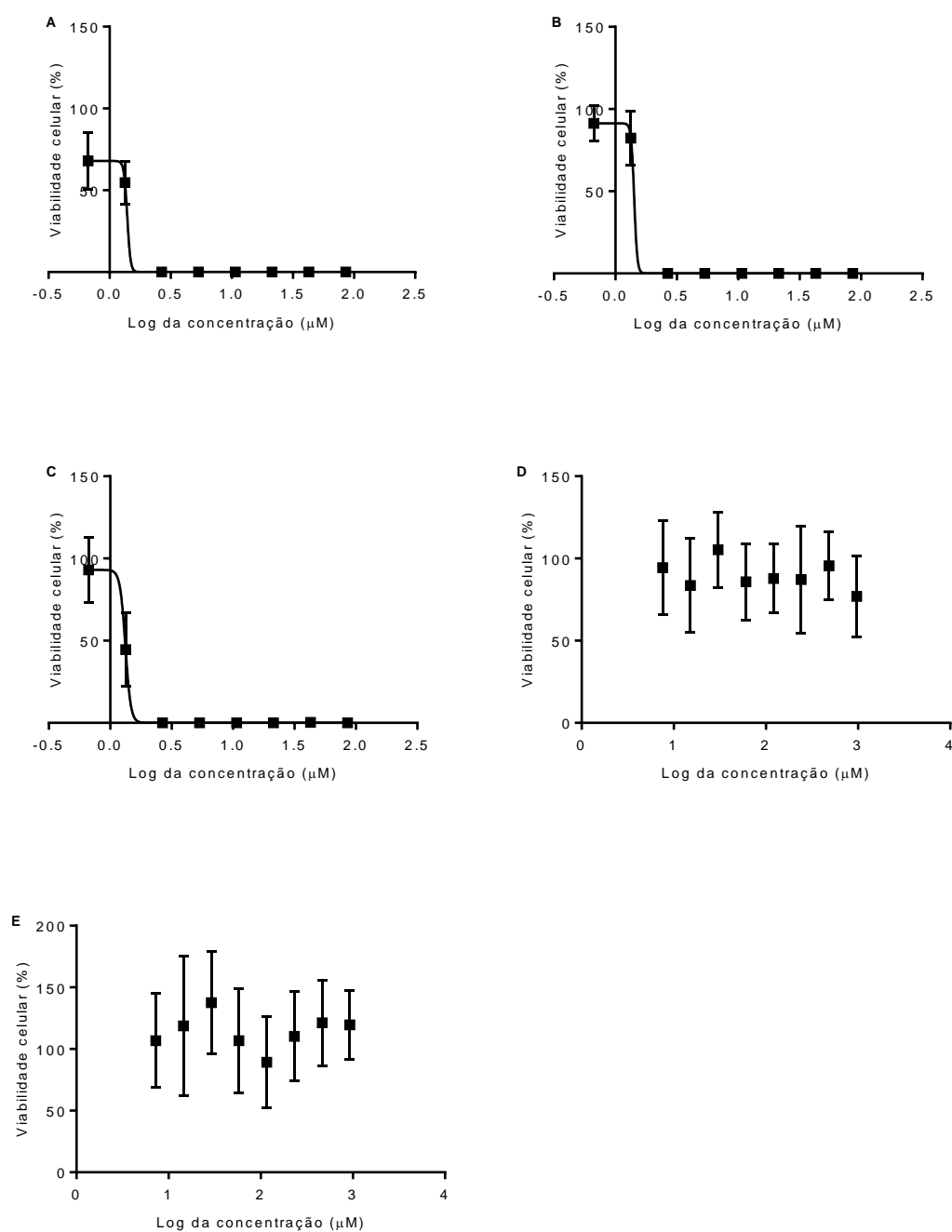


Figura 1. Avaliação da citotoxicidade da papaína livre e complexada com β -ciclodextrina e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina sobre células Caco-2 após 48 horas de exposição. **A.** papaína livre; **B.** papaína complexada com β -ciclodextrina; **C.** papaína complexada com 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina; **D.** β -ciclodextrina. **E.** 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina. Os dados representam média \pm desvio padrão de dois ensaios independentes ($n = 12$).

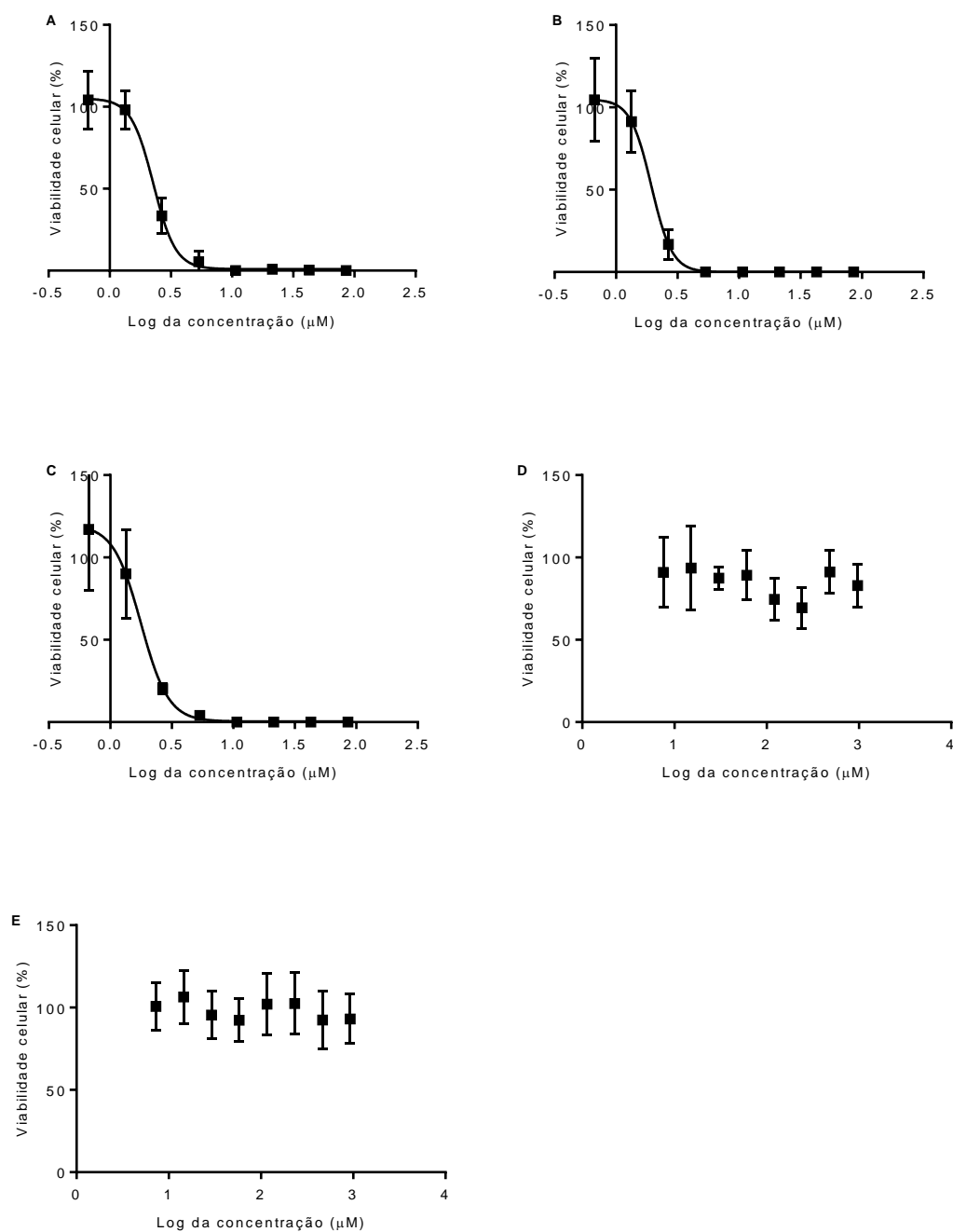


Figura 2. Avaliação da Citotoxicidade da papaína livre e complexada com β -ciclodextrina e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina sobre células HT29-MTX após 48 horas de exposição. **A.** papaína livre; **B.** papaína complexada com β -ciclodextrina; **C.** papaína complexada com 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina; **D.** β -ciclodextrina. **E.** 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina. Os dados representam média \pm desvio padrão de dois ensaios independentes ($n = 12$).

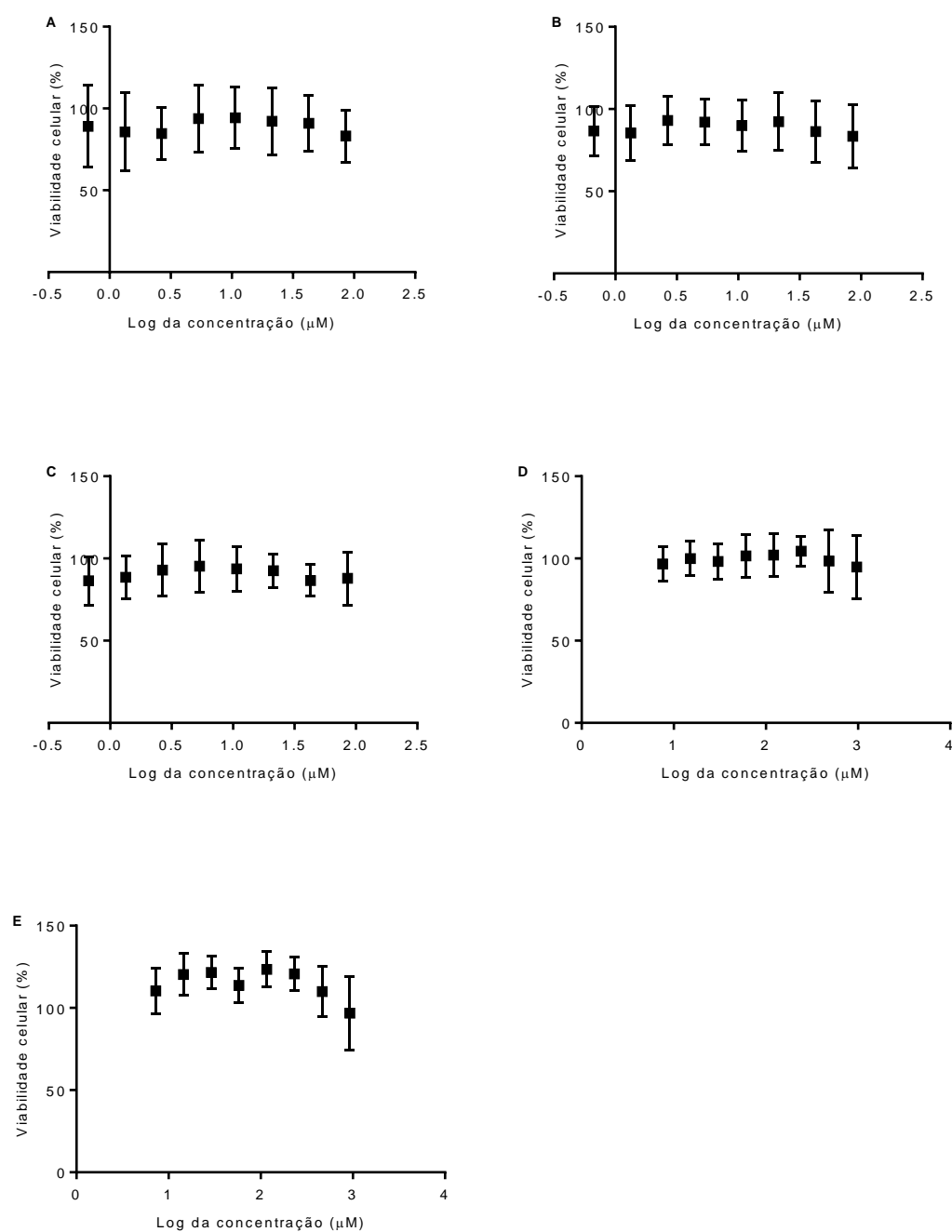


Figura 3. Avaliação da citotoxicidade da papaína livre e complexada com β -ciclodextrina e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina sobre células Raji após 48 horas de exposição. **A.** papaína livre; **B.** papaína complexada com β -ciclodextrina; **C.** papaína complexada com 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina; **D.** β -ciclodextrina. **E.** 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina. Os dados representam a média \pm desvio padrão de dois ensaios independentes (n = 12).

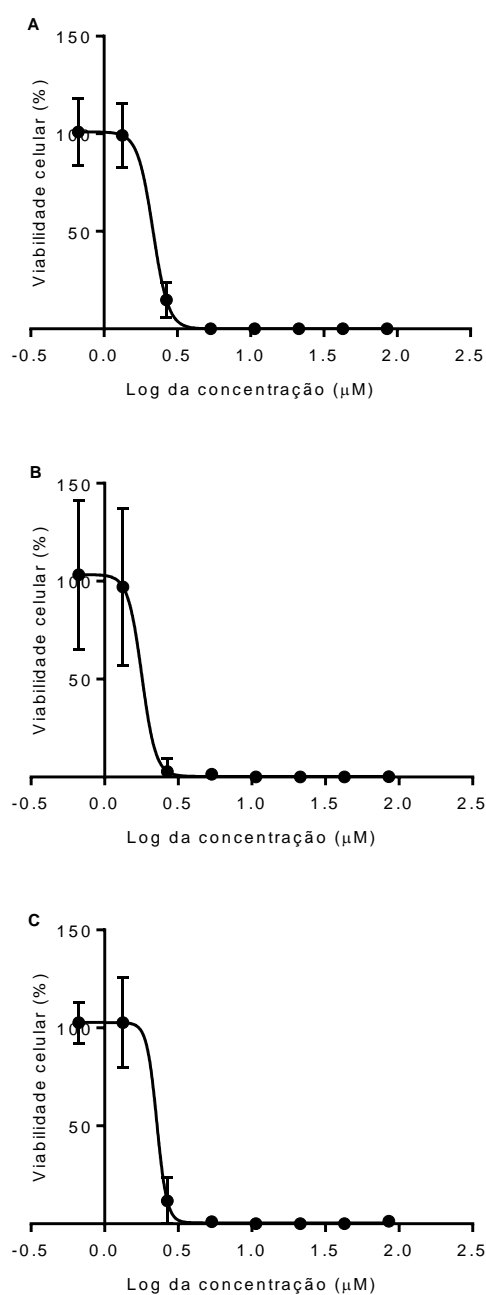


Figura 4. Avaliação da citotoxicidade da papaína livre e complexada com β -ciclodextrina e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina sobre a co-cultura de células Caco-2 e HT29-MTX após 2 horas de exposição. **A.** papaína livre; **B.** papaína complexada com β -ciclodextrina; **C.** papaína complexada com 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina. Os dados representam média \pm desvio padrão de dois ensaios independentes ($n = 12$).

Tabela 2. Valores de IC₅₀ (μM) das amostras de papaína livre (PPN) e complexada (PPN-β-CD e PPN-HP-β-CD) para as linhagens de células Caco-2 e HT29-MTX e para a co-cultura de células Caco-2 e HT29-MTX.

Linhagem Celular	IC ₅₀ (μM)				
	PPN	PPN-β-CD	PPN-HP-β-CD	β-CD	HP-β-CD
Caco-2	1,4	1,4	1,3	-	-
HT29-MTX	2,3	1,9	1,8	-	-
Raji	-	-	-	-	-
Co-cultura Caco-2 e HT29-MTX	2,2	1,8	2,3	-	-

DP: desvio padrão; PPN: papaína livre; PPN-β-CD: papaína complexada com β-ciclodextrina; PPN-HP-β-CD: papaína complexada com 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina; β-CD: β-ciclodextrina; HP-β-CD: 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina,

4.2 Avaliação da atividade enzimática da papaína presente nos minicomprimidos após o ensaio de dissolução

A atividade da enzimática da papaína presente nos minicomprimidos após o ensaio de dissolução foi calculada de acordo com a equação da reta da curva analítica mostrada na Figura 2, do item 4.1 do Capítulo 1. O valor obtido foi de $78,7 \pm 3,2\%$.

A papaína é uma enzima muito sensível que apresenta baixa estabilidade sob determinadas condições. Os principais fatores que levam a diminuição de sua atividade é a presença de água, temperatura elevada e a presença de metais que podem levar a autólise e oxidação e provocar alterações na estrutura da enzima e à perda de sua atividade (ZULLI *et al.*, 2010).

4.3 Avaliação da permeabilidade da furosemida através da tripla co-cultura de células Caco-2, HT29-MTX e Raji

No geral, os ensaios de permeabilidade *in vitro* avaliam a cinética de transporte (fluxo) das moléculas do fármaco da solução doadora para a solução receptora através de uma barreira, que pode ser baseado em células (Caco-2) ou somente em fosfolípidos (PAMPA) (DI CAGNO; BIBI; BAUER-BRANDL, 2015).

O PAMPA emprega a utilização de lipídeos que mimetizam as membranas biológicas. Embora o PAMPA seja muito versátil, esse ensaio permite apenas o estudo da via de difusão passiva, já que este modelo não apresenta junções oclusivas e transportadores de membrana, podendo subestimar a permeabilidade de fármacos com características específicas (REIS; SINKÓ; SERRA, 2010).

Diferentemente dos modelos animais, os modelos *in vitro* apresentam relativamente menor custo e são considerados uma ferramenta adequada para a avaliação inicial da

toxicidade e da permeabilidade de uma grande quantidade de candidatos a fármacos (SCHIFFELERS *et al.*, 2014).

Muitos modelos de epitélio intestinal *in vitro* foram desenvolvidos e são usados para avaliar a permeabilidade de moléculas bioativas (BELOQUI; DES RIEUX; PRÉAT, 2016). As células Caco-2 são amplamente utilizadas como um modelo de enterócitos humanos por diversos autores (JØRGENSEN; ARTURSSON; BECHGAARD, 1993; GOLÇALVES *et al.*, 2012; WATKINS *et al.*, 2017).

Em condições adequadas, essas células diferenciam-se e apresentam características morfológicas e bioquímicas semelhantes aos enterócitos, formando uma monocamada de células polarizadas com microvilosidades na borda apical que são unidas por junções oclusivas e também expressam diversos transportadores e bombas de efluxo como a glicoproteína-P e hidrolases responsáveis por sua atividade enzimática (ARTURSSON; KARLSSON, 1991).

A utilização dessas células é considerada o padrão ouro para avaliação da permeabilidade de diversas moléculas (LEE *et al.*, 2015) e preditivo com os modelos de permeabilidade *in vivo* (LENNERNÄS, 1998).

Apesar da utilização das células Caco-2 ser considerada uma boa ferramenta para a avaliação da permeabilidade oral *in vitro*, o epitélio intestinal também é composto de células caliciformes secretoras de muco (células caliciformes ou de Goblet), células enteroendócrinas, células de Paneth e células M. De acordo com ÖLANDER *et al.* (2016), esse modelo apresenta limitações por não mimetizar condições suficientemente similares às encontradas no intestino humano, dentre elas a ausência de outras populações celulares que compõe o epitélio intestinal, destacando-se células produtoras de muco que desempenham um papel importante na permeabilidade intestinal.

Uma das estratégias que podem ser aplicadas com o propósito de melhorar a representação do modelo *in vivo* é a inclusão de outras linhagens celulares que podem ser co-cultivadas com as células Caco-2, criando um modelo muito mais próximo com a barreira intestinal (HILGENDORF *et al.*, 2000). Segundo ANTOINE *et al.* (2015), a combinação de células Caco-2 e de células HT29-MTX secretoras de muco em uma co-cultura, torna o ensaio de avaliação da permeabilidade mais compatível com a barreira epitelial intestinal humana.

As células HT-29 diferenciam-se, após confluência, em uma pequena proporção de células secretoras de muco (células caliciformes ou de Goblet) e células absorptivas (VÁZQUEZ *et al.*, 2013). As células HT29-MTX foram obtidas após adaptação das células HT-29 ao tratamento com metotrexato (LESUFFLEUR *et al.*, 1993) e são consideradas uma subpopulação celular estável e homogênea totalmente diferenciada em células secretoras do muco encontrado no intestino grosso (GAGNON *et al.*, 2013).

Além disso, a co-cultura das células Caco-2 com células Raji linfócitos B é uma outra estratégia interessante para se obter um modelo que reproduza de forma mais semelhante o epitélio intestinal. De acordo com LAI; D'SOUZA, (2008), células Caco-2 quando cultivadas com células Raji têm a capacidade de adquirir o fenótipo de célula M, uma das principais células envolvidas na apresentação de antígenos e transporte de materiais particulados.

Apesar do baixo número de células M no folículo linfoide associado ao epitélio (placa de Peyer) do trato gastrointestinal, elas desempenham uma função importante na absorção de micro-organismos, macromoléculas e partículas. Essas células são caracterizadas pela presença de uma menor quantidade de microvilosidades e uma menor camada de muco (DES RIEUX *et al.*, 2006).

Essas células podem captar antígenos por endocitose e transportá-los para os macrófagos e outras células apresentadoras de antígenos, as quais podem desencadear um processo imunológico. A alta capacidade transcitótica das células M permite também o transporte de uma ampla variedade de substâncias, incluindo micro e nanopartículas, que são transportadas pela circulação linfática e não sofrem metabolismo de primeira passagem (YUN; CHO; PARK, 2013).

Atualmente, diversos autores utilizam o modelo de tripla co-cultura por ser a mais fisiológica e a que apresenta maior acurácia com morfofisiologia da parede intestinal.

ANTUNES *et al.* (2013) avaliaram o modelo *in vitro* baseado na tripla co-cultura de células de Caco-2, HT-29 e Raji e sugerem que esse modelo é confiável para obtenção de resultados próximos à realidade fisiológica observada da barreira intestinal para absorção de proteínas tanto em solução quanto contidas em nanocarreadores.

ARAÚJO e SARMENTO (2013) propuseram o modelo de tripla co-cultura composta de células Caco-2, HT29-MTX e Raji para mimetizar o epitélio intestinal humano, apresentando os componentes principais no processo de absorção do fármaco, ou seja, as células absorptivas que se assemelham a enterócitos, as células produtoras de muco e as células imunológicas, respectivamente. Os resultados apresentados indicam que as linhagens celulares apresentaram boa manutenção de suas funções quando co-cultivadas e foi o primeiro estudo a identificar a diferenciação fenotípica das células Raji em linfócitos B por meio de técnicas imunohistoquímicas, concluindo que o modelo apresentado é considerado uma alternativa confiável para os métodos *in vitro* existentes que avaliam a permeabilidade de fármacos.

SCHIMPEL *et al.* (2014) desenvolveram o modelo de tripla co-cultura de células Caco-2, HT29-MTX e Raji para avaliar a permeabilidade e interação de nanopartículas com a mucosa intestinal e concluíram que esse modelo é uma ferramenta eficiente para avaliação de permeabilidade transcelular e captação de sistemas particulados e possui boa correlação com modelos *ex vivo*.

Após a determinação da citotoxicidade e o efeito das amostras contendo papaína sobre a viabilidade celular, foram realizados os ensaios de permeabilidade empregando o modelo de tripla co-cultura de células Caco-2, HT29-MTX e Raji. É válido ressaltar que esse trabalho é o primeiro a empregar esse modelo de cultura celular para avaliar a capacidade da papaína em promover a permeação oral de um fármaco de baixa permeabilidade.

A capacidade promoção de permeação está associada a diferentes mecanismos de ação. De acordo com GÓMEZ *et al.* (2018), modificações nas junções oclusivas presente entre as células adjacentes, diminuição da camada de muco que recobre a superfície celular, alterações na fluidez da membrana celular e a inibição da glicoproteína-P (P-gp) podem contribuir com permeação de fármacos. WANG *et al.* (2012) considera que a administração concomitante de promotores de permeação paracelular com fármacos de baixa permeabilidade é uma estratégia para melhorar sua absorção oral.

Todas as culturas utilizadas nesses experimentos cresceram sobre uma membrana semipermeável e foram cultivadas por 21 dias para assegurar a expressão de suas características específicas para que fosse avaliada a capacidade dos compostos contendo papaína em promover a permeação da furosemida, conhecida por ser um fármaco que apresenta baixa permeabilidade, de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (LINDENBERG; KOPP; DRESSMAN, 2004).

A furosemida é um diurético de alça que é utilizado por via oral para o tratamento da hipertensão relacionada ao edema pulmonar agudo e à insuficiência cardíaca congestiva (MARTINDALE, 2012).

Embora a furosemida seja muito utilizada na terapia anti-hipertensiva, ela apresenta baixa solubilidade e permeabilidade devido a características físico-químicas intrínsecas da molécula e também a ativação de mecanismos bioquímicos de múltipla resistência aos fármacos. A furosemida, por ser considerada um ácido fraco, não é capaz de atravessar a camada epitelial por simples difusão. Além disso, furosemida é um substrato da P-gp, ou seja, essa bomba de efluxo é responsável pela intensa secreção desse fármaco para o lúmen intestinal (GRANERO *et al.*, 2010).

Essas características contribuem com o fato da necessidade de administração de elevadas doses de furosemida, o que pode levar ao aparecimento de eventos adversos e esse fármaco possui uma permeabilidade muito limitada ao longo do trato gastrointestinal, o que contribui com sua baixa biodisponibilidade (NIELSEN *et al.*, 2016).

De acordo com AVDEEF; TAM (2010), apesar de apresentar uma baixa extensão de absorção, uma pequena parcela da furosemida é capaz de ser absorvida através de mecanismos paracelulares e assim exercer sua atividade terapêutica.

Durante os ensaios de permeabilidade, a integridade biofísica da monocamada de células foi avaliada por meio da determinação da RET nos períodos iniciais e após 2 horas de ensaio (Figura 5).

Os valores de RET obtidos estão muito próximo com os valores encontrados no cólon humano (SJÖBERG *et al.*, 2013). Essa região do intestino grosso é considerada menos permeável em relação ao intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) e isso reflete nos valores nos valores de RET encontrados estarem acima de $500 \Omega \cdot \text{cm}^2$.

Embora seja possível visualizar que houve uma diminuição dos valores de RET em relação aos valores iniciais medidos, houve a manutenção da integridade da monocamada formada. Isso indica que possivelmente as concentrações de papaína empregadas durante esses experimentos não foram capazes de degradar as junções oclusivas e promover o descolamento das células aderidas de forma significativa.

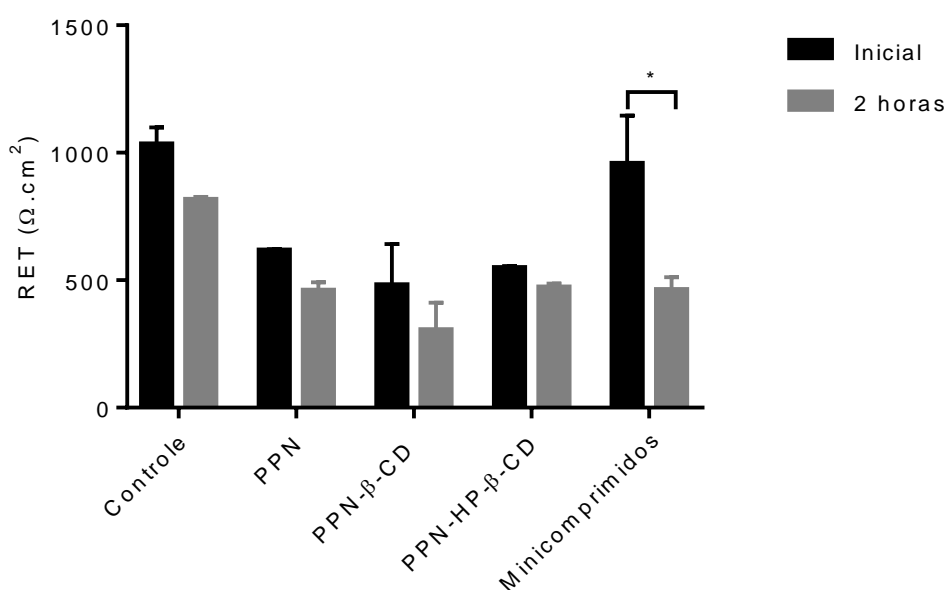


Figura 5. Valores de RET (Resistência Elétrica Transepitelial) ($\Omega \cdot \text{cm}^2$) em monocamada de células Caco-2 e HT29-MTX antes e após a exposição por 2 horas das células às amostras de papaína na concentração de $0,7 \mu\text{M}$ e furosemida na concentração de $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. **PPN.** papaína livre; **PPN-β-CD.** papaína complexada com β-ciclodextrina; **PPN-HP-β-CD.** papaína complexada com 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina. Os dados representam média \pm desvio padrão *p < 0,05 seguido de análise *Two-way* ANOVA e teste de Bonferroni.

Os resultados de permeabilidade aparente (P_{app}) utilizando o modelo de tripla co-cultura de células Caco-2, HT29-MTX e Raji obtidos após a realização dos ensaios de permeabilidade foram considerados baixos e não significativos (Tabela 3 e Figura 6).

Entretanto, as amostras de papaína complexada com ciclodextrina conseguiram melhor promover a permeação da furosemida através do epitélio, comparando-se ao valor de P_{app} da furosemida isolada.

É sugerido que existam 3 mecanismos importantes para o aumento da permeabilidade. O primeiro mecanismo possível poderia ser explicado pela ação da papaína, que foi capaz de exercer alguma ação proteolítica diretamente nas junções oclusivas e isso favoreceu a permeação paracelular da furosemida (STREMNITZER *et al.*, 2015).

O segundo mecanismo poderia ser explicado pela interação de regiões hidrofóbicas das ciclodextrinas com lipídeos presentes na bicamada lipídica, o que poderia ter levado à depleção de colesterol e consequentemente desestabilização da membrana celular e favorecimento da permeação transcelular (IRIE; UEKAMA, 1997), embora a utilização de ciclodextrinas seja considerada segura para administração oral (LOFTSSON *et al.*, 2016).

O terceiro mecanismo proposto pode ser devido a própria complexação da papaína com a ciclodextrina, que pode ter conferido proteção ao seu sítio catalítico e resíduos hidrofóbicos além de ter aumentado sua solubilidade e favorecido sua capacidade em atravessar a barreira de muco e atingir as junções oclusivas entre as células (VARCA *et al.*, 2010). Além disso, é sugerido que as ciclodextrinas poderiam inibir o mecanismo de efluxo expresso pelas P-gp. ARIMA *et al.* (2004), afirma que a dimetil- β -ciclodextrina poderia inibir a função da P-gp devido a sua capacidade em sequestrar não somente o colesterol, mas também alguns fosfolipídeos presentes na bicamada lipídica das células Caco-2.

Essas células estão ligadas por complexos juncionais proteicos intercelulares localizados principalmente na porção apical dessas células. Esses complexos juncionais apicais são compostos por três regiões distintas denominadas de junções oclusivas, aderentes e desmossomos que se conectam com proteínas de ancoragem do citoesqueleto e estabilizam a adesão célula-célula, permitindo a manutenção morfológica polarizada da monocamada celular (LUNDQUIST; ARTURSSON, 2016).

As junções oclusivas constituem a principal barreira para o transporte paracelular de íons e macromoléculas. A dimensão do espaço paracelular é da ordem de 10 Å. O tamanho médio dos poros criados pelas junções estreitas epiteliais é de aproximadamente 7 a 9 Å para o jejuno, 3 a 4 Å para o íleo e 8 a 9 Å para o cólon no intestino humano (TOMITA *et al.*, 1988).

Estes dados sugerem que moléculas com um raio molecular superior a 15 Å (aproximadamente 3,5 kDa) não podem ser transportados através desta via (RUBAS *et al.*, 1996).

Alguns estudos que utilizaram a monocamada de células Caco-2 como modelo para avaliação da permeabilidade apontam que a papaína pode ser considerada uma boa promotora de permeação de compostos que possuem baixa permeabilidade através desse epitélio. Essa enzima é capaz de promover abertura das junções oclusivas presente entre

essas células, o que é comprovado com a diminuição em paralelo dos valores de RET e isso favorece a difusão paracelular e a biodisponibilidade desses compostos (BOCK *et al.*, 1998; GRABOVAC *et al.*, 2007).

A espessura do muco no cólon varia entre 110 - 160 μm e é secretado pelas células caliciformes a uma taxa de 1-100 $\mu\text{m}.\text{s}^{-1}$ e sua principal função é atuar como uma barreira física, impedindo a permeação de nutrientes, solutos e micro-organismos (CONE, 2009). A principal mucina intestinal - MUC2, possui os domínios centrais que são protegidos por glicanos e as regiões carboxi e amino terminais são estabilizados com numerosas ligações cruzadas entre os aminoácidos da cisteína. As enzimas digestivas são incapazes de digerir os glicanos além do amido e de alguns dissacarídeos, deixando as mucinas intactas (JOHANSSON; SJÖVALL; HANSSON, 2013).

Entretanto, é sugerido que a presença do muco tenha colaborado com a minimização da atividade da papaína. Segundo LORKOWSKI (2012), o muco pode estar relacionado com a diminuição da atividade dessa enzima em atuar como promotora de difusão paracelular.

Essa hipótese é sustentada pela conhecida atividade mucolítica que a papaína possui em clivar as ligações peptídicas presentes nas glicoproteínas do muco e que não foi muito pronunciada utilizando as concentrações de papaína descritas anteriormente.

Embora a maior parte do epitélio do TGI seja recoberto por uma camada de muco, ATUMA *et al.* (2001) demonstrou a existência de duas camadas distintas de muco de diferentes espessuras sobre as células epiteliais do cólon e que variam de espessura ao longo do trato gastrointestinal: uma camada aderente à mucosa e uma camada luminal que é facilmente removível por digestão enzimática, erosão ou por sucção.

Após a secreção das células caliciformes, o muco é hidratado e se expande rapidamente, construindo uma camada densa estratificada e aderente que recobre intimamente o epitélio e funciona como uma camada de muco “não agitada” que protege as células do peristaltismo e diminui a absorção de íons e demais solutos (AMBORT *et al.*, 2012)

Essa compartimentalização do muco funciona como uma barreira física e é importante para a manutenção da homeostase. Em condições fisiológicas, as bactérias comensais são bem toleradas pelo organismo e desempenham um papel importante no metabolismo de algumas substâncias e também na proteção imunológica do cólon (HAMER *et al.*, 2008), entretanto, alterações na biossíntese da MUC2 e na espessura do muco, podem levar ao desencadeamento de processos infecciosos e inflamatórios intestinais que podem ser precursores do desenvolvimento de câncer de cólon (BETGE *et al.*, 2016; CONZE *et al.*, 2010; LARSSON *et al.*, 2011).

Tabela 3. Permeabilidade aparente (P_{app}) (cm.s^{-1}) da furosemida na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ isolada e associada às amostras contendo papaína na concentração de $0,7 \mu\text{M}$ e minicomprimidos de papaína livre e do metoprolol na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ através da monocamada de células Caco-2 e HT29-MTX em pH 7,4.

Amostra	P_{app} ($\times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$)
Furosemida	$0,6 \pm 0,2$
Furosemida e papaína livre	$0,5 \pm 0,0$
Furosemida e papaína complexada com β -ciclodextrina	$0,7 \pm 0,0$
Furosemida e papaína complexada com 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina	$0,9 \pm 0,3$
Furosemida e minicomprimidos de papaína livre	$3,6 \pm 0,4$
Metoprolol	$7,1 \pm 1,3$

Os dados representam média \pm desvio padrão.

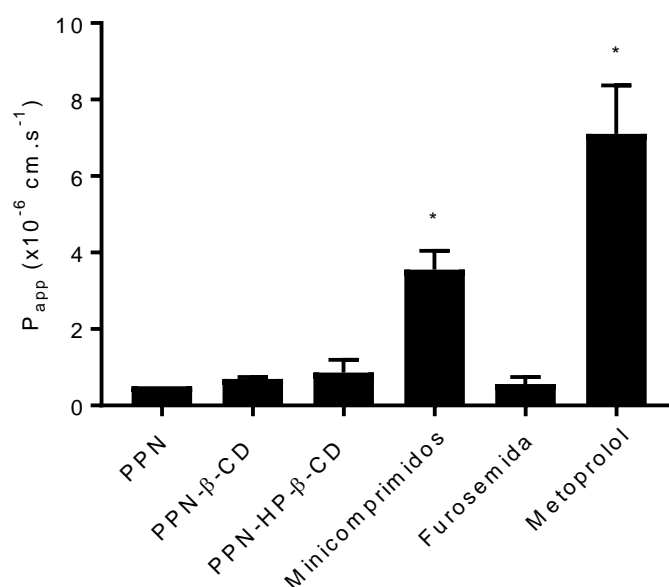


Figura 6. Permeabilidade aparente (P_{app}) (cm.s^{-1}) da furosemida na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ isolada e na presença das amostras contendo papaína na concentração de $0,7 \mu\text{M}$ e de minicomprimidos de papaína livre e do metoprolol na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em monocamada de células Caco-2 e HT29-MTX em pH 7,4 após exposição de 2 horas. **PPN.** papaína livre; **PPN- β -CD.** papaína complexada com β -ciclodextrina; **PPN-HP- β -CD.** papaína complexada com 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina. Os dados representam média \pm desvio padrão * $p < 0,05$ comparado ao controle negativo (furosemida) seguido de análise de variância One-way ANOVA e teste de Bonferroni.

Para avaliação da função da P-gp presente nas células Caco-2, foi utilizado a rodamina 123, através da avaliação de seu transporte bidirecional do compartimento apical para o compartimento basolateral e vice-versa. A rodamina 123 possui a capacidade de atravessar a membrana celular, entretanto, ela é substrato específico da P-gp, o que pode dificultar a sua capacidade em atravessar a membrana (SHAPIRO; LING, 1997). A taxa de efluxo foi de $0,1 \pm 0,0$ indicando a presença funcional da P-gp na membrana celular apical.

Para garantir a avaliação das condições de integridade da monocamada de células Caco-2 e HT29-MTX, não é suficiente apenas medir os valores de TER. Nesse caso, foi utilizado o LY é foi utilizado como marcador da integridade paracelular da monocamada de células Caco-2 e HT29-MTX durante a realização dos ensaios de permeabilidade. A P_{app} foi de $3,8 \times 10^{-7} \text{ cm.s}^{-1}$ e pode ser considerada adequada. Segundo WANG *et al.* (2009), valores de P_{app} menores que $5 \times 10^{-7} \text{ cm.s}^{-1}$ indicam que houve a manutenção da integridade da monocamada de células ao longo do ensaio de permeabilidade.

Para comprovação de que as células HT29-MTX, produtoras de muco estavam ativas, foi realizada a coloração com *Alcian Blue*, que é um corante básico caracterizado por possuir elevada afinidade com as glicoproteínas ácidas da mucina. Quando esse corante entra em contato com as glicoproteínas da mucina, liga-se com alta afinidade, proporcionando uma cor azul-escura (SCOTT, 1972) (Figura 7).

O muco é constituído principalmente de água e que encolhe a uma estrutura muito fina quando desidratado. Devido a essa característica, o muco não é normalmente observado em cortes de tecido fixados em formaldeído e pode ser melhor preservado usando o fixador de Carnoy baseado em metanol, clorofórmio e ácido acético glacial (Methacarn) (PUCHTLER *et al.*, 1970).

Para comprovação de que as células HT29-MTX, produtoras de muco estavam ativas, foi realizada a coloração com *Alcian Blue*. A partir da Figura 8 é possível confirmar que o muco foi produzido com sucesso pelas células HT29-MTX em tripla co-cultura com as células Caco-2 e Raji, sendo visualizado pela coloração azul. O muco foi espalhado por toda a monocamada de células mesmo após várias etapas de lavagem. Portanto, observou-se que as células HT29-MTX são capazes de manter suas propriedades intrínsecas, produzindo muco quando cultivadas em conjunto com as outras linhagens celulares. Seu crescimento na presença de outras células é possível, sugerindo, assim, que a função primária do HT29-MTX não é influenciada pela presença de outras células. Resultados semelhantes foram encontrados por outros autores (ARAÚJO; SARMENTO, 2013; ANTOINE *et al.*, 2015; BÉDUNEAU *et al.* 2014).

A morfologia das monocamadas de células foi visualizada por meio de microscopia de fluorescência confocal, utilizando DAPI para coloração de núcleos e Alexa Fluor™ 488 Faloidina para coloração dos filamentos de actina presentes no citoesqueleto e nas

microvilosidades localizadas na superfície das células. Foi possível visualizar a monocamada confluyente de células formada, assegurando a obtenção da morfologia adequada (Figura 8).

A conversão de células Caco-2 em células M proporcionada pela presença das células Raji foi confirmada pela MEV após 7 dias de co-cultivo. Essa técnica foi utilizada para detecção da alteração morfológica do enterócito em célula M tendo em vista que ainda não foi descrito um marcador específico para célula M humana.

Conforme mostrado na Figura 9, as células Caco-2 e as células M apresentam superfícies distintas. As células Caco-2 apresentam uma borda em escova formada pela presença de uma grande quantidade de microvilosidades compactas e mais compridas ao passo que as células M apresentam microvilosidades desorganizadas, curtas e mais grossas ao longo de sua superfície apical e invaginações basolaterais que conferem a formação de um bolso (DES RIEUX *et al.* 1997; LICHTENSTEIN *et al.*, 2017; SAKHON *et al.*, 2015).

A diferenciação do enterócito em célula M já foi comprovada. KERNÉIS *et al.* (1997) realizaram o co-cultivo *in vitro* de células de placa Peyer murina recém-isoladas com monocamada de células de adenocarcinoma de cólon humano em um sistema composto por 2 câmeras. Foi verificado que alguns linfócitos presentes na câmara basolateral migraram para a monocamada e houve um aumento do número de células não enterocíticas com características morfológicas diferentes das demais células presentes na monocamada.

O mecanismo dessa conversão ainda não é conhecido. Entretanto, é sugerido que as células Raji secretem determinadas citocinas e interajam intimamente com a monocamada de células Caco-2. Esse contato influencia diretamente a diferenciação de células Caco-2 ainda não diferenciadas, levando à alterações morfológicas em seu citoesqueleto (ARAÚJO *et al.*, 2016).

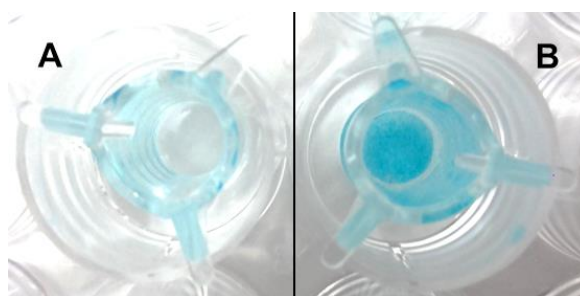


Figura 7. Coloração do muco (em azul) produzido pelas células HT29-MTX na co-cultura com as células Caco-2 e Raji fixadas com Metacarn e coradas com *Alcian Blue* (azul). A. Membrana sem células (Branco). B. Monocamada de células Caco-2 e HT29-MTX.

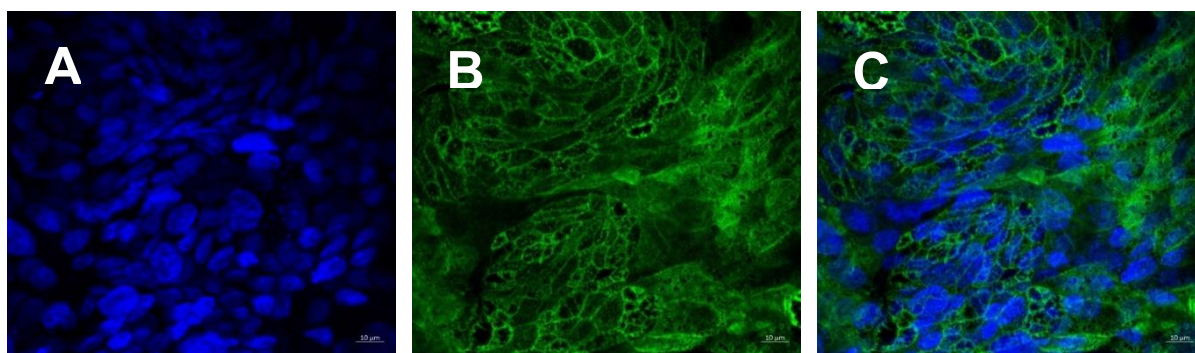


Figura 8. Avaliação da morfologia celular por meio de microscopia de fluorescência confocal de uma monocamada de células Caco-2 e HT29-MTX co-cultivadas por 21 dias. **A.** DAPI - marcando núcleos celulares. **B.** Alexa Fluor™ 488 Faloidina - marcando filamentos de actina presentes preferencialmente nas bordas celulares e microvilosidades. **C.** Sobreposição de todas as marcações (*Merged*). Aumento de 63X com óleo de imersão.

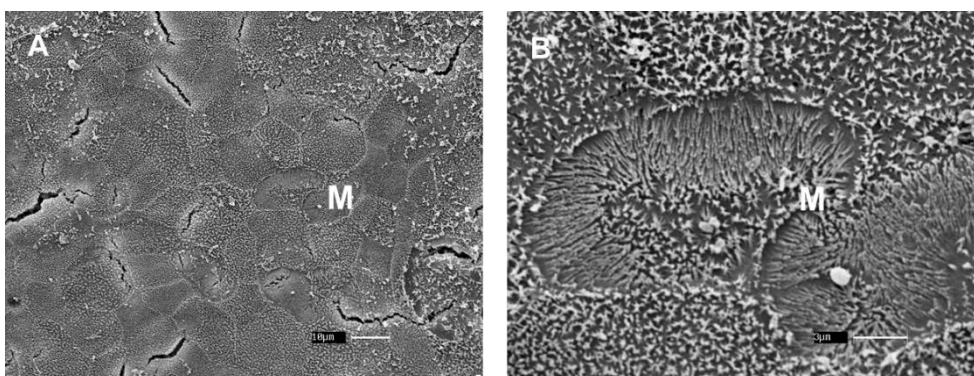


Figura 9. Identificação de células M por microscopia eletrônica de varredura. As células são identificadas pela ausência ou menor quantidade de microvilosidades em sua superfície apical. A e B são monocamada de células Caco-2 e HT29-MTX co-cultivadas com células Raji por 7 dias. M é uma célula M.

5. Conclusão

A avaliação da permeabilidade de fármacos é fundamental para a predição de sua biodisponibilidade. Para isso, a utilização da tripla co-cultura de células Caco-2, HT29-MTX e Raji como modelo *in vitro* é o modelo mais semelhante às condições fisiológicas do organismo. No presente trabalho, esse modelo foi desenvolvido e padronizado para a avaliação das amostras de papaína complexada com ciclodextrinas em promover a permeação da furosemida, um fármaco conhecido por possuir baixa solubilidade e permeabilidade nos fluidos biológicos. Além dessas amostras não serem consideradas citotóxicas nas menores concentrações empregadas, elas ainda podem favorecer a permeabilidade paracelular da furosemida. Os resultados apresentados sugerem que os compostos de papaína complexada com ciclodextrinas poderiam ser empregadas como adjuvantes farmacotécnicos na promoção de permeação de fármacos que apresentam baixa permeabilidade oral.

6. Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer a Gabriela Nemésio Fazolin, do Centro de Química e Meio Ambiente, do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares pelo suporte fornecido. A Sheila Schuindt do Carmo e ao Waldir Caldeira, do Centro de Aquisição de Imagens e Microscopia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo pela aquisição das imagens de microscopia de fluorescência confocal. A Rose Eli Grassi Rici, do Centro Avançado em Diagnóstico por Imagem, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo pela aquisição das imagens de microscopia eletrônica de varredura. A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (processo FAPESP n. 2015/19213-0) pelo financiamento do projeto.

7. Referências

- ABUHELWA, A.Y. *et al.* Food, gastrointestinal pH, and models of oral drug absorption. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.112, p.234-48, 2017.
- AMBORT, D. *et al.* Calcium and pH-dependent packing and release of the gel-forming MUC2 mucin. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.15, n.109, p.5645-50, 2012.
- AMRI, E.; MAMBOYA, F. Papain, a plant enzyme of biological importance: a review. **Am. J. Biochem. Biotechnol.**, v.8, n.2, p.99-104, 2012.
- ANTOINE, D. *et al.* Biorelevant media resistant co-culture model mimicking permeability of human intestine. **Int. J. Pharm.**, v.481, p.27-36, 2015.
- ANTUNES, F. *et al.* Establishment of a triple co-culture *in vitro* cell models to study intestinal absorption of peptide drugs. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.83, p.427-35, 2013.
- ARAÚJO, F. *et al.* *In vitro* M-like cells genesis through a tissue-engineered triple-culture intestinal model. **J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.**, v.104, n.4, p.782-8, 2016.
- ARAÚJO, F.; SARMENTO, B. Towards the characterization of an *in vitro* triple co-culture intestine cell model for permeability studies. **Int. J. Pharm.**, v.458, n.1, p.128-34, 2013.
- ARIMA, H. *et al.* Contribution of cholesterol and phospholipids to inhibitory effect of dimethyl-beta-cyclodextrin on efflux function of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein 2 in vinblastine-resistant Caco-2 cell monolayers. **Pharm. Res.**, v.21, p.625-34, 2004.
- ARTURSSON P.; KARLSSON, J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.175, n.3, p.880-5, 1991.
- ARTURSSON, P.; PALM, K.; LUTHMAN, K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.46, n.1-3, p.27-43, 2001.
- ATUMA, C. *et al.* The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state *in vivo*. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v.280, n.5, p.G.922-9, 2001.

AVDEEF, A.; TAM, K.Y. How well can the Caco-2/Madin-Darby Canine Kidney models predict effective human jejunal permeability? **J. Med. Chem.**, v.53, p.3566-84, 2010.

BALIMANE, P.V.; CHONG, S.; MORRISON, R.A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods**, v.44, n.1, p.301-12, 2000.

BÉDUNEAU, A. *et al.* A tunable Caco-2/HT29-MTX co-culture model mimicking variable permeabilities of the human intestine obtained by an original seeding procedure. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.87, p.290-8, 2014.

BELOQUI, A.; DES RIEUX, A.; PRÉAT, V. Mechanisms of transport of polymeric and lipidic nanoparticles across the intestinal barrier. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.106, Pt. B, p.242-255, 2016.

BETGE, J. *et al.* MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6 in colorectal cancer: expression profiles and clinical significance. **Virchows Arch.**, v.469, n.3, p.255-65, 2016.

BOCK, U. *et al.* Transport of proteolytic enzymes across caco-2 cell monolayers. **Pharm. Res.**, v.15, p.1393-1400, 1998.

CANO-CEBRIÁN, M.J. *et al.* Intestinal absorption enhancement via the paracellular route by fatty acids, chitosans and others: a target for drug delivery. **Curr. Drug Deliv.**, v.2, n.1, p.9-22, 2005.

CIAPPELLANO, S.G. *et al.* *In vitro* toxicity assessment of oral nanocarriers. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.106, Part. B, p.381-401, 2016.

COLLARD, E.; ROY, S. Improved function of diabetic wound-site macrophages and accelerated wound closure in response to oral supplementation of a fermented papaya preparation. **Antioxid. Redox Signal.**, v.13, n.5, p.599-606, 2010.

CONE, R.A. Barrier properties of mucus. **Adv. Drug Deliv. Rev.** v.61, p.75-85, 2009.

CONZE, T. *et al.* MUC2 mucin is a major carrier of the cancer-associated sialyl-Tn antigen in intestinal metaplasia and gastric carcinomas. **Glycobiology**, v.20, n.2, p.199-206, 2010.

DATE, A.A.; HANES, J.; ENSIGN, L.M. Nanoparticles for oral delivery: Design, evaluation and state-of-the-art. **J. Control. Release**, v.240, p.504-26, p.504-26, 2016.

DES RIEUX, A. *et al.* An improved *in vitro* model of human intestinal follicle-associated epithelium to study nanoparticle transport by M cells. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v.30, p.380-91, 1997.

DES RIEUX, A. *et al.* Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach. **J. Control. Release**, v.116, n.1, p.1-27, 2006.

DI CAGNO, M.; BIBI, H.A.; BAUER-BRANDL, A. New biomimetic barrier Permeapad™ for efficient investigation of passive permeability of drugs. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v.73, p.29-34, 2015.

EPSTEIN, M.A.; BARR, Y.M. Characteristics and mode growth of a tissue culture strain (EB1) of human lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.34, n.2, p.231-40, 1965.

FERRAZ, C.C. *et al.* Validation of *in vitro* analytical method to measure papain activity in pharmaceutical formulations. **Int. J. Pharm. Pharm. Sci.**, v.6, n.2, 658-61, 2014.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA) Waiver of *in vivo* bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system guidance for industry. **FDA**, 2017. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>>. Acesso em: 20 de maio de 2018.

GAGNON, M. *et al.* Comparison of the Caco-2, HT-29 and the mucus-secreting HT29-MTX intestinal cell models to investigate Salmonella adhesion and invasion. **J. Microbiol. Methods**, v.94, n.3, p.274-9, 2013.

GOLÇALVES, J.E. *et al.* Effect of pH, mucin and bovine serum on rifampicin permeability through Caco-2 cells. **Biopharm. Drug Dispos.**, v.33, n.6, p.316-23, 2012.

GÓMEZ, E.C. *et al.* Evaluation of the promoting effect of soluble cyclodextrins in drug nail penetration. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v.117, p.270-8, 2018.

GRABOVAC, V. *et al.* A. Papain: an effective permeation enhancer for orally administered low molecular weight heparin. **Pharm. Res.**, v.24, n.5, p.1001-6, 2007.

GRANERO, G.E. *et al.* Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: furosemide. **J. Pharm. Sci.**, v.99, n.6, p.2544-56, 2010.

GROOTHUIS, F.A. *et al.* Dose metric considerations in *in vitro* assays to improve quantitative *in vitro-in vivo* dose extrapolations. **Toxicology**, v.332, p.30-40, 2015.

HAMER, H.M. *et al.* Review article: the role of butyrate on colonic function. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v.27, n.2, p.104-19, 2008.

HILGENDORF, C. *et al.* Caco-2 versus Caco-2/HT29-MTX co-cultured cell lines: permeabilities via diffusion, inside- and outside-directed carrier-mediated transport. **J. Pharm. Sci.**, v.89, n.1, p.63-75, 2000.

HUBATSCH, I.; RAGNARSSON, E.G.; ARTURSSON, P. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. **Nat. Protoc.**, v.2, n.9, p.2111-9, 2007.

INVITROGEN™. **Presto Blue® cell viability reagent**. Versão n. 21 Mar 12. p.1-13, 2012. Disponível em: <<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/PrestoBlueFAQ.pdf>>. Acesso em 20 de maio de 2018.

IRIE, T.; UEKAMA, K. Pharmaceutical applications of cyclodextrins III. Toxicological issues and safety evaluation. **J. Pharm.Sci.**, v.86, n.2, p.147-62, 1997.

ISSA, M.G.; FERRAZ, H.G. Intrinsic dissolution as a tool for evaluating drug solubility in accordance with the biopharmaceutics classification system. **Dissolut. Technol.**, v.18, n.3, p.6-13, 2011.

JOHANSSON, M.E.; LARSSON, J.M.; HANSSON, G.C. The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.108, Supl. 1, p.4659-65, 2011.

JOHANSSON, M.E.; SJÖVALL, H.; HANSSON, G.C. The gastrointestinal mucus system in health and disease. **Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.**, v.10, n.6, p.352-61, 2013.

JØRGENSEN, L.; ARTURSSON, P.; BECHGAARD, E. Toxicological and absorption enhancing effects of glycofurol 75 and sodium glycocholate in monolayers of human intestinal epithelial (Caco-2) cells. **Int. J. Pharm.**, v.95, n.1-3, p.209-17, 1993.

KERNÉIS, S. *et al.* Conversion by Peyer's patch lymphocytes of human enterocytes into M cells that transport, **Science**, v.277, p.949-52, 1997.

KERNS, E.H. *et al.* Combined application of parallel artificial membrane permeability assay and Caco-2 permeability assays in drug discovery. **J. Pharm. Sci.**, v.93, n.6, p.1440-53, 2004.

KIM, Y.S.; HO, S.B. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. **Curr. Gastroenterol. Rep.**, v.12, n.5, p.319-30, 2010.

KÖLLNER, S. *et al.* Mucus permeating thiomers nanoparticles. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.97, p.265-72, 2015.

LAI, Y.H.; D'SOUZA, M.J. Microparticle transport in the human intestinal M cell model. **J. Drug Target.**, v.16, n.1, p.36-42, 2008.

LARSSON, J.M. *et al.* Altered O-glycosylation profile of MUC2 mucin occurs in active ulcerative colitis and is associated with increased inflammation. **Inflamm. Bowel Dis.**, v.17, n.11, p.2299-307, 2011.

LEE, J.B. *et al.* A novel *in vitro* permeability assay using three-dimensional cell culture system. **J. Biochem.**, v.205, p.93-100, 2015.

LENNERNÄS, H. Human intestinal permeability. **J. Pharm. Sci.**, v.87, n.4, p.403-10, 1998.

LESUFFLEUR, T. *et al.* Differential expression of the human mucin genes MUC1 to MUC5 in relation to growth and differentiation of different mucus-secreting HT-29 cell subpopulations. **J. Cell Sci.**, v. 106, p.771-83, 1993.

LICHTENSTEIN, D. *et al.* It takes more than a coating to get nanoparticles through the intestinal barrier *in vitro*. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.118, p.21-29, 2017.

LINDENBERG, M.; KOPP, S.; DRESSMAN, J.B. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.58, n.2, p.265-78, 2004.

LOFTSSON, T. *et al.* Pharmacokinetics of cyclodextrins and drugs after oral and parenteral administration of drug/cyclodextrin complexes **J. Pharm. Pharmacol.**, v.68, n.5, p.544-55, 2016.

LOPES, P.S. *et al.* *In vitro* safety assessment of papain on human skin: a qualitative Light and Transmission Electron Microscopy (TEM) study. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v.44, n.1, p.151-6, 2008.

LORKOWSKI, G. Gastrointestinal absorption and biological activities of serine and cysteine proteases of animal and plant origin: review on absorption of serine and cysteine proteases. **Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.**, v.4, n.1, p.10-27, 2012.

LOZOYA-AGULLO, I. *et al.* In situ perfusion model in rat colon for drug absorption studies: comparison with small intestine and Caco-2 cell model. **J. Pharm. Sci.**, v.104, n.9, p.3136-45, 2015.

LUNDQUIST, P.; ARTURSSON, P. Oral absorption of peptides and nanoparticles across the human intestine: Opportunities, limitations and studies in human tissues. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.106, n. Pt B, p.256-76, 2016.

MOELLER, E.H.; JORGENSEN, L. Alternative routes of administration for systemic delivery of protein pharmaceuticals. **Drug Discov. Today Technol.**, v.5, n.2-3, p.e89-94, 2008.

MONETTA, L. Uso da papaína nos curativos feitos pela enfermagem. **Rev. Bras. Enferm.**, v.40, n.1, p.66-73, 1987.

MUDIE, D.M.; AMIDON, G.L.; AMIDON, G.E. Physiological parameters for oral delivery and *in vitro* testing. **Mol. Pharm.**, v.7, n.5, p.1388-405, 2010.

NIELSEN, L.H. *et al.* Polymeric microcontainers improve oral bioavailability of furosemide. **Int. J. Pharm.**, v.505, p.98-109, 2016.

ÖLANDER, M. *et al.* The proteome of filter-grown Caco-2 cells with a focus on proteins involved in drug disposition. **J. Pharm. Sci.**, v.105, n.2, p.817-827, 2016.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD/OCDE). **Series on testing and assessment Test No. 129: guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests**, 2010.

PASSEY, S.; PELLEGRIN, S.; AND MELLOR, H. Scanning electron microscopy of cell surface morphology. In. **Curr. Protoc. Cell Biol.**, v.37, n.1, p.4.17.1-13, 2007.

PAULETTI, G.M. *et al.* Structural requirements for intestinal absorption of peptide drugs. **J. Control Release**, v.41, n.1-2, p.3-17, 1996.

PUCHTLER, H. *et al.* Methacarn (methanol-Carnoy) fixation. Practical and theoretical considerations. **Histochemie**, v.21, n.2, p.97-116, 1970.

REIS, J.M.; SINKÓ, B.; SERRA, C.H. Parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) - Is it better than Caco-2 for human passive permeability prediction? **Mini Rev. Med. Chem.**, v.10, n.11, p.1071-6, 2010.

RODRÍGUEZ-PIÑEIRO, A.M. *et al.* Studies of mucus in mouse stomach, small intestine, and colon. II. Gastrointestinal mucus proteome reveals Muc2 and Muc5ac accompanied by a set of core proteins. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v.305, n.5, p.G348-56, 2013.

RUBAS, W. *et al.* Flux measurements across Caco-2 monolayers may predict transport in human large intestinal tissue. **J. Pharm. Sci.**, v.85, n.2, p.165-9, 1996.

SAKHON, O.S. *et al.* M cell-derived vesicles suggest a unique pathway for trans-epithelial antigen delivery. **Tissue Barriers**, v.3, n.1-2, p. e1004975-1-12, 2015.

SCHIFFELERS, M.J. *et al.* Regulatory acceptance and use of 3R models for pharmaceuticals and chemicals: expert opinions on the state of affairs and the way forward. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, v.69, n.1, p.41-8, 2014.

SCHIMPEL, C. *et al.* Development of an advanced intestinal *in vitro* triple culture permeability model to study transport of nanoparticles. **Mol. Pharm.**, v.11, n.3, p.808-18, 2014.

SCOTT, J.E. Histochemistry of alcian blue. 3. The molecular biological basis of staining by Alcian blue 8GX and analogous phthalocyanins. **Histochemie**, v.32, n.3, p.191-212, 1972.

SHARMA, M.; SHARMA, V.; MAJUMDAR, D.K. Influence of tableting on enzymatic activity of papain along with determination of its percolation threshold with microcrystalline cellulose. **Int. Sch. Res. Notices**, v.2014, p.1-8, 2014.

SJÖBERG, Å. *et al.* drugs using the Ussing chamber technique. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v.48, n.1-2, p.166-80, 2013.

SOUZA, J.; FREITAS, Z.M.F.; STORPIRTIS, S. Modelos *in vitro* para determinação da absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/absorção. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v.43, n.4, p.515-27, 2007.

STREMNITZER, C. *et al.* Papain degrades tight junction proteins of human keratinocytes in vitro and sensitizes C57BL/6 mice via the skin independent of its enzymatic activity or TLR4 activation. **J. Investig. Dermatol.**, v.135, p.1790-1800, 2015.

SWEETMAN, S.C. (Ed.). **Martindale: the complete drug reference**. 36th ed. London: Pharmaceutical Press, 2012. 4121p.

TELGENHOFF, D. *et al.* Influence of papain urea copper chlorophyllin on wound matrix remodeling. **Wound Repair Regen.**, v.15, n.5, p.727-35, 2007.

TOMITA, M. *et al.* Enhancement of colonic drug absorption by the transcellular permeation route. **Pharm. Res.**, v.5, n.12, p.786-9, 1988.

VARCA, G.H.C. *et al.* Cyclodextrins: an overview of the complexation of pharmaceutical proteins. **Curr. Protein Pept. Sci.**, v.11, n.4, p.255-63, 2010.

VARCA, G.H.C. *et al.* Thermal characterization and cytotoxicity of complexes formed by papain and cyclodextrin. **J. Biol. Phys.**, v.33, p.463-75, 2007.

VÁZQUEZ, M. *et al.* Intestinal transport of methylmercury and inorganic mercury in various models of Caco-2 and HT29-MTX cells. **Toxicol.**, v.311, n.3, p.147-53, 2013.

WALTER, E. *et al.* HT29-MTX/Caco-2 cocultures as an *in vitro* model for the intestinal epithelium: *in vitro-in vivo* correlation with permeability data from rats and humans. **J. Pharm. Sci.**, v.85, n.10, p.1070-6, 1996.

WANG, M. *et al.* Investigation of transport mechanism of exendin-4 across Madin Darby canine kidney cell monolayers. **Biol. Pharm. Bull.**, v.35, n.5, p.745-52, 2012.

WATKINS, M.E. *et al.* Development of a novel formulation that improves preclinical bioavailability of tenofovir disoproxil fumarate. **J. Pharm. Sci.**, v.106, n.3, p.906-19, 2017.

YUN, Y.; CHO, Y.W.; PARK, K. Nanoparticles for oral delivery: targeted nanoparticles with peptidic ligands for oral protein delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.65, n.6, p.822-32, 2013.

ZULLI, G. *et al.* Influence of gamma radiation onto polymeric matrix with papain. **Radiat. Phys. Chem.**, v.79, p.286-8, 2010.

3. Conclusão

Foi possível avaliar *in vitro* a segurança da papaína livre e complexada com β -ciclodextrina e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina utilizando diversas linhagens celulares provenientes de seções do trato gastrointestinal. Dessa forma, os resultados sugerem que existe uma relação de dose-dependente para que a papaína exerça sua atividade proteolítica e promova o descolamento de células aderidas.

Além disso, foi verificado que a papaína livre e complexada com β -ciclodextrina e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina são capazes de promover a permeação da furosemida através da monocamada de células Caco-2 e da tripla co-cultura de Caco-2, HT29-MTX e Raji mediante abertura das junções oclusivas e aumento da permeabilidade paracelular.

Assim, os resultados obtidos sugerem que a capacidade proteolítica da papaína poderia ser empregada de forma segura como promotora de permeação oral para facilitar a permeação de fármacos de baixa permeabilidade.

Anexos



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



São Paulo, 18 de novembro de 2016
CEP N 3157080816

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a): Fúlvio Gabriel Corazza
Depto/Disc: Departamento De Ciências Exatas E Da Terra
Patrícia Santos Lopes (orientador)

Título do projeto: "Avaliação da permeabilidade da papaina em formulações orais para tratamento de patologias intestinais utilizando tripla co-cultura de células Caco-2, HT29-MTX e Raji como modelo in vitro".

Parecer Consultor/relatório do Comitê de Ética em Pesquisa UNIFESP/HSP

Atualmente a produção de medicamentos contendo enzimas tem sido promissora devido à magnitude de seu potencial terapêutico. A papaina é uma enzima proteolítica isolada do látex das folhas e dos frutos verdes do mamão papaya adulto (*Carica papaya* Linné) amplamente utilizada como agente debridante nos processos de cicatrização e tratamento de feridas principalmente em decorrência de sua capacidade em promover o crescimento tecidual além de ser empregada como promotora de absorção oral e cutânea. Embora muito utilizada em formulações tópicas, a papaina é pouco explorada em formulações de uso oral para o tratamento de patologias intestinais. No desenvolvimento de novos medicamentos para uso oral, os ensaios que avaliam a permeabilidade e a toxicidade de fármacos no decorrer do trato gastrointestinal são muito importantes, entretanto, por questões bioéticas, é necessária a redução da utilização de animais no âmbito da pesquisa científica para essa finalidade. Neste projeto, será avaliada a permeabilidade de formulações de uso oral contendo papaina visando o tratamento de patologias intestinais através da utilização de modelos in vitro biomiméticos de coculturas de células Caco-2, HT29-MTX e Raji. Os resultados obtidos serão divulgados e deverão contribuir de forma inovadora com a pesquisa e o desenvolvimento científico brasileiro.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo, na reunião de 15/08/2016, ANALISOU e APROVOU o protocolo de estudo acima referenciado. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. Relatórios parciais de andamento deverão ser enviados anualmente ao CEP até a conclusão do protocolo.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Miguel Roberto Jorge

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Nanotoxicologia e uso de nanopartículas de papaina

Pesquisador: Patrícia Santos Lopes

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 08111212.2.0000.5505

Instituição Proponente: Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP/EPM

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 159.960

Data da Relatoria: 23/11/2012

Apresentação do Projeto:

Conforme parecer CEP. 120.763 de 11 de outubro de 2012.

Objetivo da Pesquisa:

Conforme parecer CEP. 120.763 de 11 de outubro de 2012.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme parecer CEP. 120.763 de 11 de outubro de 2012.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Conforme parecer CEP. 120.763 de 11 de outubro de 2012.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Conforme parecer CEP. 120.763 de 11 de outubro de 2012.

Recomendações:

não se aplica

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem inadequações, pendências atendidas

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Aprovação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14

Bairro: VILA CLEMENTINO

CEP: 04.023-061

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)5539-7162

Fax: (11)5571-1062

E-mail: cepunifesp@unifesp.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO PAULO - UNIFESP/
HOSPITAL SÃO PAULO



Considerações Finais a critério do CEP:

O colegiado acatou o parecer do relator

SÃO PAULO, 30 de Novembro de 2012

Assinador por:

José Omar Medina Pestana
(Coordenador)

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14
Bairro: VILA CLEMENTINO CEP: 04.023-061
UF: SP Município: SÃO PAULO
Telefones: (11)5539-7162 Fax: (11)5571-1062 E-mail: cepunifesp@unifesp.br